attach paper 7

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikati n 6 :
C07K 16/46, A61K 39/395, G01N 33/543, C07K 16/44, A61K 51/10

A1

(11) Internati nale Ver"ffentlichungsnummer: **WO 98/08875**

(43) Internati nales Ver"ffentlichungsdatum: 5. März 1998 (05.03.98)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/04493

(22) Internationales Anmeldedatum: 18. August 1997 (18.08.97)

(30) Prioritätsdaten:
196 34 730.0 28. August 1996 (28.08.96) DE
197 03 699.6 3. Februar 1997 (03.02.97) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: VIVA DIAGNOSTIKA DIAGNOSTISCHE PRODUKTE GMBH [DE/DE]; Breite Strasse 26, D-50354 Hürth (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: BOHLEN, Heribert [DE/DE]; Auerstrasse 4, D-50733 Köln (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, BY, CA, CN, CZ, HU, IL, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RU, SI, SK, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: NOVEL COMBINATION PREPARATIONS AND THEIR USE IN IMMUNODIAGNOSIS AND IMMUNOTHERAPY

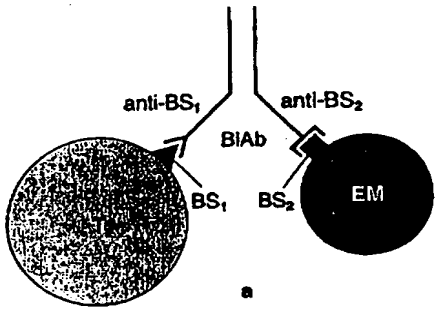
(54) Bezeichnung: KOMBINATIONSPRÄPARATIONEN UND IHRE VERWENDUNG IN DER IMMUNDIAGNOSTIK UND IMMUNTHERAPIE

(57) Abstract

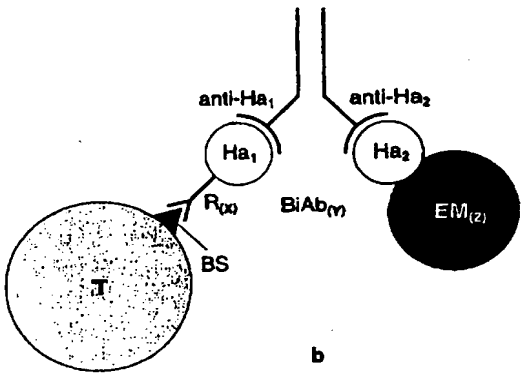
The invention concerns combination preparations comprising three components which are used for specific purposes in immunology, diagnosis and therapy. The combination is based on the universal use as a component of the combination preparations of an immuno-linker which can link two other different components provided with different determinants.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Kombinationspräparationen, bestehend aus drei Komponenten, welche für die zielgerichtete Verwendung in der Immunologie sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie Anwendungen findet. Die Kombination beruht auf der universellen Verwendung eines Immunolinkers als Bestandteil der Kombinationspräparationen, welcher zwei weitere verschiedene mit unterschiedlichen Determinanten ausgestattete Komponenten binden kann.



a



b

BNSDOCID: <WO___9808875A1_I_>

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

BNSDOCID: <WO___9808875A1_I_>

KOMBINATIONSPRÄPARATIONEN UND IHRE VERWENDUNG IN DER IMMUNDIAGNOSTIK UND IMMUNTHERAPIE

Beschreibung

Technisches Gebiet

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Kombination aus drei in der Immunologie verwendbaren Präparationen oder Formulierungen (Komponenten), bestehend aus mindestens einer mit einer definierten spezifischen, immunologisch reaktiven Determinante Ha_1 ausgestatteten bzw. verbundenen ersten Komponente, einer mindestens bispezifischen zweiten Komponente mit Bindungsspezifität für Ha_1 (anti-Ha_1) und für mindestens eine weitere Bindungsspezifität für eine definierte spezifische, immunologisch reaktive Determinante Ha_2 (anti-Ha_2) oder mit weiteren Bindungsspezifitäten für mehrere solcher Determianten Ha_n (anti-Ha_n), welche untereinander verschieden sind, und einer dritten Komponente, welche mit mindestens einer definierten spezifischen, immunologisch reaktiven Determinante Ha_2 oder mit mehreren solcher Determinanten Ha_n ausgestattet bzw. verbunden ist oder sind, wobei Ha_1, Ha_2 und Ha_n untereinander verschieden sind.

Die erfindungsgemäße Kombination findet allgemein Anwendung in der Immunologie, sowohl in der Immundiagnostik als auch als prophylaktisches und therapeutisches wertvolles Mittel.

Stand der Technik

Der zielgerichteten Verwendung von Stoffen für diagnostische oder immunhistochemische und therapeutische Zwecke, um bestimmte Gewebe und Zellen des tierischen Körpers, insbesonders des Menschen, spezifisch und effizient zu erreichen ("Targeting"), liegt der Gedanke zugrunde, geeignete Mittel oder Wirkstoffe an gewünschte, spezifische Orte außerhalb (*in vitro*) oder innerhalb (*in vivo*) des Körpers zu transportieren und dort binden zu lassen und andere Gewebe und Zellen *in vitro* oder *in vivo* von diesem "Targeting" auszuschließen.
Zum Erreichen dieses Ziels stehen im Prinzip drei Methoden zur Verfügung. Zum einem kann ein eine gewünschte Wirkung entfaltender Stoff lokal an eine

Körperstelle, beispielweise topisch, appliziert werden. Dieses Verfahren besitzt jedoch die Nachteile, daß nur Stellen des Körpers erreicht werden können, die direkt zugänglich sind und daß der betreffende Stoff aufgrund von Diffusionsvorgängen nicht nur am gewünschten Ort und dort mit rasch abnehmender Intensität seine Wirkung entfaltet.

Zum anderen besteht die Möglichkeit anhand der bestimmten chemischen und physiologischen Eigenschaften bestimmter Agentien, diese Stoffe durch ihre Bioverteilung in bestimmten Körperbereichen (Organen, Geweben) anreichern zu lassen. Der Nachteil dieser Verfahren besteht insbesondere darin, daß die Verwendung dieser Stoffe eng begrenzt wird durch ihre chemische Beschaffenheit, sodaß Bioverteilung und ortspezifische Wirkung oft nicht in der erhofften Weise in Einklang gebracht werden können.

Als dritte und modernste Möglichkeit wird seit ca. zwei Jahrzehnten versucht, bestimmte Proteine, insbesondere Antikörper, als Vehikel für ein zielgerichtetes Transportieren von Wirksubstanzen zu verwenden, um derartige Stoffe an gewünschte Stellen *in vitro* oder *in vivo* für immundiagnostische oder immunhistochemische und immuntherapeutische Zwecke zu bringen. Durch die Verfügbarkeit von monoklonalen Antikörpern seit Mitte der siebziger Jahre (KÖHLER, G. & MILSTEIN, C., Nature 256, 495 - 497,1975) wurden Mittel in die Hand gegeben, intensive diagnostische, immunhistochemische und therapeutische Untersuchungen und Prüfungen mit entsprechend modifizierten monoklonalen Antikörpern (Mabs) durchzuführen.

Aufgrund der unzureichenden Fähigkeit der monoklonalen Antikörper *per se* therapeutisch oder diagnostisch Effizient zu sein, sind gerade in letzter Zeit Bemühungen unternommen worden, diese Effizienz dadurch zu erhöhen, daß verschiedene Agenzien oder Effektormoleküle, z.B. bakterielle oder pflanzliche Toxine, Radionuklide oder cytotoxische Substanzen mit Mabs konjugiert bzw. kovalent verbunden wurden. Derartige Immunokonjugate werden seither in der Diagnose und Therapie verwendet (GOLDENBERG, D. M., Immunol. Today 10, 286 - 288, 1989).

Nicht zuletzt wegen verschiedener Nachteile dieser Immunokonjugate wurden alternative Moleküle für das "Targeting" hergestellt. Bispezifische Antikörper wurden entwickelt, welche zwei verschiedene antigen-spezifische Bindungsstellen besitzen: eine für Tumor assoziiertes Antig n, auch als "target binding arm" bezeichnet, und eine andere für das Effektormolekül ("effector binding arm").

BNSDOCID: <WO__9808875A1_I_>

Derartige bispezifische Antikörper haben ein Spektrum an potentiellen Verwendungsmöglichkeiten sowohl in der Immundiagnostik, Immunhistochemie, Immunhistologie, Immuncytologie als auch bei der Immuntherapie zur zielgerichteten Applikation cytotoxischer, cytocidaler oder cytostatischer Substanzen.

Gegenüber den Immunokonjugaten besitzen die bispezifischen Antikörper verschiedene Vorteile: cytotoxische Substanzen können ohne vorherige Spaltung der kovalenten Bindung an den gewünschten Zielorten freigesetzt werden und unspezifische toxische Wirkungen können verringert werden. Bispezifische Antikörper (beispielsweise der IgG Klasse) sind strukturell bivalent oder multivalent (insbesondere IgM) aber funktionell monovalent für jede Antigenbindungsstelle.

Eine Übersicht über die Herstellung und Verwendung bispezifischer Antikörper in der Diagnostik und Therapie geben beispielsweise die Artikel von SONGSIVILAI, S. & LACHMANN P. J., Clin exp. Immunol. 79, 315 - 321, 1990; RENNER, C. & PFREUNDSCHUH, M., Immunol. Rev. 145, 179 - 209, 1995; HAMILTON, R. G., Clin. Chem. 39 (9), 1988 - 1997, 1993; FANGER, M. W. & GUYRE, P. M., Tibtech 6, 375 - 380, 1991; Fanger, M. et al., Crit. Rev. Immunol. 12 (3,4), 101 - 124, 1992; FANGER, W. M. et al., Immunomethods 4, 72 - 81, 1994, und BRISSINCK, J. et al., Drugs of the Future 17 (11), 1003 - 1010, 1992.

Bekannt ist die Verwendung von bispezifischen Antikörpern mit dualer Spezifität bei Immunoassays, beim Tumor "Targeting", zum Kreuzverbinden ("cross-linking") zellulärer Antigene und "Targeting" von Effektorzellen, zur spezifischen Freisetzung von Wirkstoffen an Zielzellen oder zum Triggern von Effektorzellen, welche nach Stimulation zelluläre Zytotoxizität vermitteln (beispielsweise phagozytische Zellen, natürliche Killerzellen [NK-Zellen] oder T-Lymphocyten).

Bekannt sind bispezifische Antikörper, welche über Hybridhybridoma hergestellt wurden, die einerseits eine Spezifität gegen das CD3 Protein (T-Zell Rezeptor Komplex) auf der Effektorzelle aufweisen und andererseits spezifisch gegen die Igκ-1b Kette des Immunoglobulins der Ratte sind (GILLILAND, L. K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7719 - 7723, 1988). Dieser bispezifische Antikörper war in der Lage, *in vitro* die Zielzelle in Kooperation mit T-Zellen (Thymon der Maus) zu lysieren. BERG, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4723 - 4727, 1991, beschreiben einen bispezifischen Antikörper, dessen einer Arm aus dem

BNSDOCID: <WO___9808875A1_I_>

Fusionsprotein CD4-γ1/κ(L)Kette und dessen anderer Arm aus einem CD3-γ1/κ Paar bestand. Der Arm mit dem Fusionsprotein band HIV gp120, der gegenüberliegende Arm reagierte mit CD3 (T-Zell Rezeptor) und aktivierte die zytotoxische T-Zelle. Es konnte gezeigt werden, daß dieser Antikörper HIV infizierte Zellen lysierte.

Weitere bispezifische Antikörper mit Tumor zerstörenden Eigenschaften bzw. Triggerfunktion zellulärer Cytotoxizität sind bekannt von beispielsweise BRISSINCK, J. et al., J. Immunol. 147, 4019 - 4026, 1991. In der Publikation von JUNG, G. et al., Eur. J. Immunol. 21, 2431 - 2435, 1991, werden bispezifische Antikörperfragmente vom IgG_{2a} Typ (Fab und $F(ab')_2$) beschrieben, die spezifisch mit Zielzellen (Melanoma) und gegen CD3 bzw. CD28 reagieren. Diese anti-Melanoma x anti-CD3 und anti-Melanoma x anti -CD28 Konjugate zerstörten die Zielzellen *in vitro* und eröffnen eine sytemische Anwendung *in vivo* für die Tumortherapie über T-Zell Stimulierung.

Ein bispezifischer Antikörper wurde über chemische Kopplung ("cross-linking") hergestellt, der sowohl gegen ein Epitop der β-Kette von Fibrin als auch gegen Urokinase (scuPA) gerichtet war. Dieses bispezifische Konstrukt vermochte sowohl die fibrinolytische Effizienz als auch die Fibrinspezifität von scuPA zu erhöhen, indem Fibrinmonomere und Plasmaverklumpungen mit diesem Antikörper gegenüber der alleinigen Wirkung von scuPA signifikant erhöht werden konnte (CHARPIE, J. R. et al., Biochemistry 29, 6374 - 6378, 1990). In einem anderen Fall konnte gezeigt werden, daß ein über "cross-linking" konstruierter bispezifischer Antikörper, der einerseits spezifisch war für tPA (tissue plasminogen activator) andererseits für Fibrin, die fibrinolytische Aktivität von tPA erhöhen konnte (BODA, C. et al., J. Biol. Chem. 264, 944 - 948, 1989).

Eine antivirale Wirkung von heterokonjugierten bispezifischen Antikörpern wird von STAERZ, U. D. et al., Eur. J. Immunol. 17, 571 - 574, 1987, beschrieben. Die hierbei verwendeten Antikörper waren spezifisch gegen T-Zell Antigen Rezeptor und spezifisch gegen Hämagglutinin (HA) oder gegen Nukleoprotein eines Influenza Virus. Hierdurch konnte eine Lyse der durch das Virus infizierten Zellen erreicht werden. In einem anderen Fall wurden über Hybridhybridoma hergestellte bispezifische Antikörper mit dualer Spezifität für TCR x HA Influenza A (Fusion zwischen IgG2b spezifisch gegen Influenza Virus HA und IgG2a spezifisch gegen V β8 von TCR) erfolgreich zur Inhibition der Influenza Virus Replikation verwendet.

BNSDOCID: <WO___9808875A1_I_>

Eine Zellyse von mit HIV infizierten Zellen durch bispezifische Antikörperkonjugate (anti-HIV-1gp110:anti-CD3/TCR Komplex oder anti-gp110:anti-CD16Fcγ-R) wurde beschrieben von ZARLING, J. M. et al., J. Immunol. 140, 2609 - 2613, 1988. Bispezifische Antikörperheterokonjugate mit den Spezifitäten anti-CD3:anti-HSV-1 gpC oder anti-FcγRIII:anti-HSV-1gpD erhöhten die Immunität gegen Herpes Simplex Virus (HSV) Infektionen bzw. zerstörten HSV infizierte Zellen (PAYA, C. V. et al., J. Immunol. 142, 666 - 671, 1989).

Targeting von $CD4^+$ Helfer/Killer Zellen durch einen anti-CD3 x anti-Glioma bispezifischen Antikörper verursachte zusammen mit IL-2 aktivierten $CD4^+$-Helfer/Killer Zellen einen Anstieg an Zytotoxizität gegen Gliomazellen *in vitro*, sodaß hiermit eine adoptive Tumorimmuntherapie vorgeschlagen wurde. Auch eine Inhibition von Colontumorwachstum konnte mit einem bispezifischen Antikörper der Spezifität anti-c-erb-B2:anti-CD3 plus $CD4^+$ positiven Zellen erreicht werden (NISHIMURA, T. et al., J. Immunol. 148, 285 - 291, 1992). An 10 Patienten konnte *in vivo* die Wirkung gegen malignes Gliom mit einer derartigen adoptiven Immuntherapie unter Verwendung eines chemisch konjugierten anti-CD3 monoklonalen Antikörpers plus anti-Glioma Antikörper mit Lymphokin (rekombinantes IL-2) aktivierten Killerzellen gezeigt werden (NITTA, T. et al., The Lancet 335, 368 - 371, 1990). Von DONOHUE, J. H. et al., Cancer Research 50, 6508 - 6514, 1990, wird in ähnlicher Weise beschrieben, daß ein bispezifisches Reagenz (Immunheteroaggregat) mit der Spezifität anti-CD3 x anti-Tumorantigen durch *in vitro* aktivierte periphere Blutlymphocyten (PBLs) Ovarialkarzinomzellen *in vitro* lysierte.

In einer früheren Arbeit (RAMMENSEE, H.-G. et al., Eur. J. Immunol. 17, 433 - 436, 1987) wurden Antikörper, die spezifisch waren für $V\beta8^+$ T-Zell Rezeptoren, mit 2,4,6-Trinitrophenyl (TNP) haptenisiert und mit Rezeptoren von TNP-spezifischen B-Zellen verbunden. Dieses Konstrukt lysierte TNP-spezifische B-Hybridome und Blastzellen von Mäusen, die transgen waren hinsichtlich μ,κ eines TNP-spezifischen Antikörpers. Ein targeting der Effektorfunktionen von zytotoxischen T-Lymphocyten (CTL) konnte damit über Antigen-spezifische Rezeptoren an Antigen-spezifische B-Lymphozyten erfolgen und die Anzahl an B-Zellen *in vivo* manipuliert (erniedrigt) werden.

Neben B- und/oder T-Zellen wurden auch aktivierte Makrophagen als Effektorzellen in Verbindung mit bispezifischen Antikörpern vorgeschlagen. Erste klinische Prüfungen mit derartig getriggerten Makrophagen sollen eine erhöhte Tumorlyse bestätigt haben (BAUER, T. & DRAKEMAN, D. L., Vox Sang 61, 156 - 157, 1991).

Periphere mononukleare Blutzellen (PBMCs) als Effektorzellen werden von MÉNARD, S. et al., Int. J. Biol. Markers 4 (3), 131 - 134, 1989, offenbart, wobei als bispezifisches Reagenz ein anti-CD3 x anti-Ovarkarzinom Antikörper zur Lyse der Zielzellen (Ovarialkarzinom) verwendet wurde.

Bekannt ist auch, daß bispezifische Antikörper zur Anwendung bei immundiagnostischen Assays (ELISA) und in der Immunhistochemie geeignet sind. Ein Beispiel für diese Anwendung wird beschrieben von MILSTEIN, C. & CUELLO, A. L., Nature 305, 537 - 540, 1983. In diesem Fall konnte mit einem anti-Somatostatin x anti-Peroxidase bispezifischen Antikörper immunhistochemisch Somatostatin in bestimmten Hypophysenregionen nachgewiesen werden.

MICHAELSEN, T. E., Eur. J. Immunol. 21, 11 - 16, 1991, stellten chimäre anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP) Antikörper her, die auch mit dem Hapten p-Nitrophenylphosphat (NIP) reagierten, um damit die Complement vermittelte lytische Eigenschaften von IgG Isotypen zu untersuchen. Es wurden durch die Markierung mittels zweier verschiedener Haptene eine Verteilung von zwei verschiedenen Antigenen auf den Zielzellen festgestellt.
Gemäß der Publikation von JU, S.-T. et al., Mol. Immunol. 26 (3), 283 - 292, 1989, wurden durch Fusion einer Myelomzellinie, die α/λ_2 Antikörper produzierte, und einer Hybridomlinie, die μ/λ_1 Antikörper produzierte *inter alia* Immunglobuline der Serotypen IgM und IgA sezerniert, die bispezifisch waren für sowohl das Hapten 2,4-Dinitrophenyl (DNP) als auch für das Hapten 4-Hydroxy-3-nitrophenylacetyl (NP). Grundlage der Untersuchung war hierbei festzustellen, welche Molekülklassen der L- und H-Ketten nach Myelom-Hybridom Fusionen welche Haptene (NP und/oder DNP) mit welcher Avidität zu binden vermochte und um zu bestimmen, welche Bedeutung die $V\lambda_1$ und $V\lambda_2$ Sequenzen (L-Ketten) bei der Entstehung der Antikörperaktivität haben. Es wurde eine duale Bindungseigenschaft bei κ, λ_1 und λ_2 der anti-NP Antikörper festgestellt.

Neben den vorgenannten Verwendungen sind für bispezifische Antikörper spezifische, duale Bindungen an CD3 und CD25 (p55 Kette des IL-2 Rezeptors) beschrieben worden. Ein solcher anti-CD3:anti-CD25 bispezifischer Antikörper war in der Lage, selektiv an aktivierte CD25 exprimierende T-Zellen und Lymphoma zu binden, wobei beide Antigene CD3 und CD25 erkannt und von aktivierten T-Zellen koexprimiert werden. Bekannterweise sind T-Zellen Hauptmediatoren bei

Abstoßungsreaktionen und bei einer Anzahl von Autoimmunerkrankungen. Entgleisende oder dysregulierte T-Zellen spielen somit eine wichtige Rolle in vielen Autoimmunerkrankungen und lymphoproliferativen Krankheiten (z.B. Lymphome). Von MACLEAN, J. A. et al., J. Immunol. 150, 1619 - 1628, 1993, konnte gezeigt werden, daß anti-CD3:anti-CD25 bispezifische monoklonale Antikörper Cytolyse von CD25 tragenden alloreaktiven T-Zellen und bei cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) mit undefinierter Spezifität bewirken. Da eine derartige "redirected" Cytolyse einen engen räumlichen Kontakt von CTL mit $CD25^+$ Zellen verlangt, ist ein therapeutischer Effekt für solche Gewebe und Zellen zu erwarten, die durch aktivierte CTL infiltriert sind, wie es in Organen mit Zellabstoßungsreaktionen oder Autoimmuneffekten der Fall ist. Im vorliegenden Fall konnte durch den anti-CD3:anti-IL-2 Rezeptor (anti-CD25) bispezifischen Antikörper eine wirkungsvolle CTL Stimulation erreicht werden, um CD25 Antigen tragende PHA (Phytohemagglutinin) stimmulierte T-Zellen und IL-2 Rezeptor positive Tumorzellen zu lysieren.

In einem anderen Fall konnten über CD3:CD19 bispezifische Antikörper T-Zellen von Patienten mit chronisch lymphocytischer Leukämie, in Kombination mit monospezifischen, bivalenten anti-CD28 Antikörpern, aktiviert werden. Hierbei wurden insbesondere CD_4^+ T-Zellen aktiviert und zur Proliferation angeregt. Es war eindeutig eine starke Abnahme der Anzahl von $CD19^+$ malignen B-Zellen zu erreichen, wohingegen sowohl mit anti-CD3:anti-CD19 bispezifischen Antikörpern für sich allein als auch auch mit den einzelnen Antikörpern anti-CD3 plus anti-CD19 plus anti-CD28 keine solche Abnahme erzielt werden konnte, aber auch keine Stimulation von $CD2^+$, $CD4^+$ und $CD25^+$ T-Lymphocyten. In diesem Fall konnte nur mit der Kombination anti-CD3:anti-CD19 plus anti-CD28 eine Cytotoxizität gegen autologe maligne B-Zellen erreicht werden. Eine derartige T-Zell Aktivierung war selbst mit sehr geringen Dosen der eingesetzten Antikörper (1 ng/ml) zu erhalten. Eine Stimulierung von T-Zellen mit der genannten Kombination von bispezifischen und monospezifischen, bivalenten Antikörpern war mit einem starken Anstieg einer IL-2, IL-6 und Interferon-γ Sekretion der betreffenden T-Zellen verbunden. Für die Therapie von chronisch lymphocytischer Leukämie wird eine solche Vorgehensweise vorgeschlagen (BOHLEN, H. et al., Blood 82, 1803 - 1812, 1993).

BNSDOCID: <WO___9808875A1_I_>

Weitere Verwendungen bispezifischer Antikörper, auch in Kombination mit anderen anti-CD Antikörpern, sind in der vielfältigen Literatur beschrieben und sind dem Fachmann bekannt. Es soll hierbei *inter alia* auf die entsprechenden Übersichtsartikel und auf die weitere in der Publikation von BOHLEN, H. et al., 1993, *loc cit.*, zitierte Literatur verwiesen werden.

Weiterhin sind erfolgreiche cytolytische Wirkungen von bispezifischen Antikörpern bekannt bei renalem Zellkarzinomen (VAN, D.J. et al., Int. J. Cancer 43, 344, 1989), Melanomen (JUNG, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84, 4611, 1987), Gliomen (NITTA, T. et al., J. Neurosurg. 72, 426, 1990), Lymphomen (GRAVELLE, M. & OCHI, A., J. Immunol. 142, 4079, 1989), Leukämien (OSHIMI, K. et al., Blood 77, 1044, 1991) und bei Arzeimittel-resistenten Tumorzellen (VAN, D.J. et al., Int. J. Cancer 44, 738, 1989).

Die im Stand der Technik beschriebenen bispezifischen und zum Teil auch trispezifischen Antikörper und damit verbunden die mit diesen Reagenzien und Agenzien durchgeführten Bestimmungsmethoden und therapeutischen Verfahren und Maßnahmen haben jedoch eine Reihe gravierender Nachteile.

Für jede Änderung von mindestens einer von zwei oder mehreren Bindungsspezifitäten eines Antigens (z.B. Epitop, Zielzelle, Oberflächenrezeptor), an die ein bispezifischer Antikörper binden soll, ist die Herstellung eines völlig neuen bispezifischen Antikörpers notwendig. Dies macht die bisher bekannten bispezifischen Systeme des "targetings", des Triggerns oder des Markierens aufwendig, unflexibel und teuer.

Bei der direkten Kopplung von großen Molekülen (z.B. Marker-, Reporter- oder Effektormolekülen) an einen bispezifischen Antikörper können die Bindungseigenschaften des betreffenden bispezifischen Antikörpers verändert bzw. verschlechtert werden, was zu Problemen bei beispielsweise immunhistochemischen oder immuncytologischen Markierungen mit Farbstoffen und Enzymen oder bei diagnostischen Testsystemen, aber auch bei immuntherapeutischen Maßnahmen führen kann.

Ein weiterer Nachteil entsteht bei der bisherigen direkten Kopplung von Farbstoffen, Enzymen oder Effektormolekülen an einen Antikörper dadurch, daß für jedes neu gewählte Molekül (z.B. Effektormolekül), für das der Antikörper eine Spezifität hat, immer eine erneute Kopplung an einen neuen Antikörper erfolgen muß. Das hat zur Folge, daß die Anzahl der zu synthetisierenden Konjugate gleich

ist der Anzahl der gewählten Moleküle pro Antikörper. In einem solchen Fall ergibt sich eine Vielzahl an Endprodukten. Für beispielsweise 100 Antikörper mit unterschiedlicher Spezifität und beispielsweise 5 verschiedenen Reporter- oder Effektormolekülen müßten demzufolge 500 verschiedene Produkte hergestellt werden, um die gewünschten Reporter- oder Effektormoleküle an den gewünschten Ort (beispielsweise zu Testzwecken) zu bringen.

Jedes neue Einbringen eines Antigens in ein Testsystem oder in ein Therapieschema, beispielsweise in der Immundiagnostik, bei ELISAs, Immunocytochemie, optischen Immunoassays usw. als auch bei der Immuntherapie für ein targeting von Zielzellen oder Tumormarkern usw. zieht nach dem bekannten Stand der Technik für jede neue Kombination eine aufwendige und teuere Entwicklung, Charakterisierung und Herstellung eines neuen Antikörperkonstrukts nach sich.

Darstellung der Erfindung und bevorzugte Ausführungsformen

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, Mittel und neue Verfahren zur Verfügung zu stellen, die die Nachteile des Standes der Technik beseitigen.

Gelöst wurde die Aufgabe gemäß Anspruch 1 dadurch, daß eine Kombinationspräparation bereitgestellt wird, bestehend aus mindestens einer mit einer definierten spezifischen, immunologisch reaktiven Determinante Ha_1 ausgestatteten bzw. verbundenen ersten Komponente, einer mindestens bispezifischen zweiten Komponente mit Bindungsspezifität für Ha_1 (anti-Ha_1) und für mindestens eine weitere Bindungsspezifität für eine definierte spezifische, immunologisch reaktive Determinante Ha_2 (anti-Ha_2) oder mit weiteren Bindungsspezifitäten für mehrere solcher Determianten Ha_n (anti-Ha_n), welche untereinander verschieden sind, und einer dritten Komponente, welche mit mindestens einer definierten spezifischen, immunologisch reaktiven Determinante Ha_2 oder mit mehreren solcher Determinanten Ha_n ausgestattet bzw. verbunden ist oder sind, wobei Ha_1, Ha_2 und Ha_n untereinander verschieden sind.

Im weiteren wird zur Vereinfachung der Ausdruck "definierte spezifische, immunologisch reaktive Determinante" ersetzt durch den synonym zu verstehenden Begriff "Determinante" bzw. durch die Bezeichnungen "Ha_1", "Ha_2" und "Ha_n".

Die erste mit einer Determinanten Ha_1 verbundene bindungsspezifische Komponente 1 umfaßt ein Reagenz mit spezifischen Bindungseigenschaften, das es befähigt, an Zellen, Geweben oder spezifischen Strukturen des tierischen und menschlichen Körpers *in vitro* und *in vivo* zu binden. Insbesondere umfaßt das Reagenz ein Protein vorzugsweise ein Immunglobulin oder Antikörper oder einem Fragment oder Derivat davon oder einen beliebigen Liganden mit den oben genannten Bindungseigenschaften bzw. Spezifitäten für eine antigene Bindungsstelle, beispielsweise ein Lectin, oder Adhäsionsmoleküle, Cytokine oder Chemokine, von denen bekannt ist, daß sie Rezeptoren und andere Bindungstellen von Geweben, Zellen oder Strukturen des Körpers erkennen und dort spezifisch und zielgerichtet anlagern können. Bevorzugt ist für diese erste Komponente ein Antikörper.

Die zweite, mindestens bispezifische Komponente 2 umfaßt ein Mittel bzw. Reagenz mit mindestens bispezifischen Eigenschaften, beispielsweise einen inerten Partikel oder ein Protein mit Spezifität für mindestens zwei Determinanten, wobei das Protein ein Ligand sein kann, beispielsweise ein Immunoglobulin bzw. Antikörper oder ein Lectin, oder aus einem beliebigen Linkermolekül, welches Bindungsspezifität für die gewünschten Determinanten Ha_1, Ha_2 bzw. Ha_n aufweist, wobei mindestens eine Determinanten-erkennungsstelle komplementär ist für Ha_1, eine andere für Ha_2 oder eine oder mehrere weitere für Ha_n. Bevorzugt ist ein bispezifischer Antikörper mit anti-Ha_1 und anti-Ha_2 Spezifität, welcher mit mindestens zwei verschiedenen Determinanten reagieren kann, wobei ein Reaktionspartner die Determinante Ha_1, der andere Ha_2 ist, wobei Ha_1 und Ha_2 verschieden sind.

Als dritte Komponente 3 der erfindungsgemäßen Kombination kommt ein mit einer Determinante Ha_2 verbundenes Effektormolekül oder ein Reportermolekül in Betracht, vorzugsweise ein Antikörper, eine beliebige Markersubstanz, ein Enzym, eine radioaktive Substanz, ein Kontrastmittel, biologisch aktive Substanzen, ein cytostatisch, cytocidal oder cytotoxisch wirkendes Agens oder beliebige Substanzen und Antigene, sowie Adhäsionsmoleküle, Cytokine oder Chemokine, von denen bekannt ist, daß sie spezifische Bindungstellen an Zellen oder Strukturen des Körpers eines Säugetieres erkennen und dort spezifisch und zielgerichtet anlagern können.

Die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen finden breite, universelle Verwendung in der Immunologie, insbesondere auf dem Gebiet der Immundiagnostik, der Immunhistochemie oder Immunhistologie, Immuncytologie und der Immuntherapie. Der Bereich der Anwendung umfaßt aber auch die Prognose und Bestimmung von Krankheitszuständen, bei denen die erfindungsgemäße Kombinationspräparationen Wirkung entfalten, aber auch die prophylaktische Verwendung beispielsweise zur Verhütung des Ausbruchs oder der Entwicklung eines Krankheitszustandes oder zur Verhinderung einer Exazerbation eines Krankheitszustandes.

Darüberhinaus sind die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen breit und universell verwendbar bei der therapeutischen Behandlung von solchen Krankheiten, welche bekannterweise immunologischen, therapeutischen Verfahren zugänglich sind. Insbesondere betrifft dies Infektionskrankheiten und Erkrankungen, bei denen ein Tumorgeschehen zugrundeliegt. Aber auch bei der Immunisierung bzw. für die Vaccinierung, insbesondere mit Tumorproteinen, eignen sich die erfindungsgemäßen Kombinationen in gleicher hervorragender Weise.

Demzufolge besteht die vorliegende Erfindung aus drei Komponenten oder Formulierungen, wobei das Kernstück der erfindungsgemäßen Kombination die Verwendung eines mindestens bispezifischen Mittels bzw. Reagenz ist, welches Spezifität für mindestens zwei untereinander verschiedenen Determinanten Ha_1 und Ha_2 bzw. Ha_n hat.

Insofern umfaßt die vorliegende Erfindung nicht nur die Kombination der drei genannten Präparationen. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher auch die Verwendung eines Mittels bzw. Immunolinkers *in vivo* und *in vitro* mit Bindungsspezifität für mindestens zwei verschiedene Determinanten zum Verbinden von mindestens zwei mit verschiedenen Determinanten ausgestatteten Mitteln oder Reagenzien sowohl in der Diagnostik, in der Therapie bzw. Immuntherapie oder für Immunisierungszwecke.

Das der Erfindung zugrundeliegende Prinzip besteht darin, daß die mit mindestens einer Determinanten Ha_1 ausgestattete Komponente 1 mit einer spezifischen Bindungstelle, beispielsweise auf der Oberfläche einer Zelle, beispielsweise mit einer Antigenbindungsstelle, einem Epitop, einer Rezeptorbindungsstelle, mit einer

BNSDOCID: <WO___9808875A1_I_>

Adhäsionsmolekülbindungsstelle oder mit einem Zuckerrest spezifisch reagiert und daran bindet, diese über ihre Determinante Ha_1 oder Determinanten Ha_n mit der entprechenden anti-Ha_1 bzw. anti-Ha_n Spezifität einer mindestens bispezifischen Komponente 2 (mit anti-Ha_1 und anti-Ha_2 bzw. anti-Ha_n Spezifitäten) reagiert und daß mindestens eine weitere mit einer Determinante Ha_2 oder mehreren verschiedenen Determianten Ha_n ausgestattete Komponente 3 an die anti-Ha_2 bzw. anti-Ha_n Erkennungsstelle der Komponente 2 bindet.

Die einzelnen Komponenten sind erfindungsgemäß als eine funktionelle Einheit zu verstehen, wonach sowohl eine gemeinsame zielgerichtete Verwendung dieser drei Einzelbestandteile als auch das räumliche Nebeneinander dieser einzelnen Mittel (als kit-of-parts) umfaßt werden. Umfaßt wird aber auch die Verwendung der Komponente 2 *per se* für immunologische Zwecke zur Herstellung einer Präparation zum Verbinden von mindestens zwei unterschiedlichen mit jeweils mindestens zwei untereinander verschiedenen Determinanten ausgestatteten Mitteln oder Molekülen oder Reagenzien.

Als Determinanten Ha_1, Ha_2 bzw. Ha_n kommen erfindungsgemäß Haptene, spezifische, koppelbare antigene Strukturen, Epitope, Paratope, Idiotope in Frage. Als bevorzugte Determinanten Ha_1, Ha_2 bzw. Ha_n werden Haptene umfaßt.

Der allgemeinen Definition für die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen liegt gemäß Tabelle 1 folgendes Schema für die Zusammensetzung der drei Komponenten zugrunde:

BNSDOCID: <WO___9808875A1_I_>

Tabelle 1

Komponente 1:	(T):X—Ha_1
Komponente 2:	anti-Ha_1—Y—anti-Ha_2 bzw. anti-Ha_1—Y—anti-Ha_n
Komponente 3:	Ha_2—Z bzw. Ha_n—Z

worin

(T) ein Zielort bzw. ein "target", insbesondere eine spezifische, biologische Bindungsstruktur oder Bindungsstelle, beispielsweise auf der Oberfläche einer Zelle oder einer Membran oder eines Teils davon, beispielsweise ein Antigen, ein Allergen, ein Epitop, ein Rezeptor, eine Adhäsionsmolekülbindungsstelle, ein Zuckerrest, eine Droge, ein Toxin, woran, ohne Beteiligung einer Determinanten Ha_1, X—Ha_1 binden kann, wobei (T) nicht als Bestandteil der erfindungsgemäßen Komponente 1 zu verstehen ist, sondern nur erklärenderweise zur Veranschaulichung und daher in Klammern dargestellt wurde,

X ein mit einer Determinante Ha_1 ausgestattetes bzw. verbundenes Reagenz ist, welches monospezifisch hinsichtlich seines Zielortes (T) sein kann, beispielsweise umfassend ein Protein, ein Immunglobulin bzw. ein Antikörper oder ein Derivat oder Fragment davon, ein Ligand, ein Lectin, ein Rezeptorbindungsmolekül, ein Adhäsionsmolekül, ein Cytokin, ein Chemokin, ein Lymphokin,

Ha_1 eine definierte spezifische, immunologisch reaktive Determinante, beispielsweise umfassend ein Hapten, eine spezifische koppelbare antigene Struktur, ein Epitop, ein Paratop, ein Idiotop,

Y ein mindestens für mindestens zwei Determinanten Ha_1 und Ha_2 bzw. Ha_n bispezifisches Reagenz beispielsweise umfassend ein inerter Partikel, ein Protein, ein Immunoglobulin bzw. ein Antikörper, ein Diabody, mit den entsprechenden anti-Ha_1, anti-Ha_2 bzw. anti-Ha_n Spezifitäten,

Ha_2 eine von Ha_1 verschiedene, definierte spezifische, immunologisch reaktive Determinante, b ispielsweise umfassend ein Hapten, eine spezifische koppelbare antigene Struktur, ein Epitop, ein Paratop, ein Idiotop,

Ha_n eine beliebige andere von Ha_1 und Ha_2 verschiedene definierte spezifische, immunologisch reaktive Determinante, beispielsweise umfassend ein Hapten, eine spezifische koppelbare antigene Struktur, ein Epitop, ein Paratop, ein Idiotop,

Z ein mit mindestens einer Determinante Ha_2 bzw. Ha_n ausgestattetes bzw. verbundenes biologisch, chemisch oder physikalisch wirksames oder detektierbares koppelbares Mittel, beispielsweise umfassend ein Effektormolekül, ein Rezeptorbindungsmolekül, ein Immunglobulin bzw. Antikörper, eine Markersubstanz, ein Enzym, eine radioaktive Substanz, eine radioaktiv markierte Substanz, ein Kontrastmittel, eine biologisch aktive Substanz, ein cytotoxisch, cytocidal, cytostatisch oder cytolytisch wirkendes Mittel oder ein beliebiges Antigen mit Effektor- Marker- oder Reporterfunktion, eine Wirkstoffvorstufe (prodrug), ein Adhäsionsmolekül, ein Cytokin, ein Lymphokin, ein Chemokin, ein Ligand,

bedeuten.

Wenn beispielsweise X monospezifisch hinsichtlich seines Zielortes (T) ist, beispielsweise im Falle, daß X ein Antikörper, ein Rezeptorbindungsmolekül, ein Adhäsionsmolekül oder ein Lectin ist, kann das Reagenz X an eine spezifische biologische Bindungsstruktur oder an Teilen davon binden, beispielsweise umfassend eine Zelloberflächenstruktur, ein Antigen, ein Allergen, ein Epitop, ein Rezeptor, eine Adhäsionsmolekülbindungstelle oder Teile der genannten Strukturen, oder einen Zuckerrest, eine Droge, ein Toxin.

Eine solche spezifische, biologische Bindungsstruktur oder Teile davon können natürlichen Ursprungs sein oder über DNA Rekombinantion, synthetisch oder semisynthetisch hergestellt werden, oder, insbesondere betreffend Antigene und Epitope aus biologischen und nicht-biologischen Flüssigkeiten stammen bzw. darin enthalten sein.

Zum grundsätzlichen Verständnis sei erklärend ausgeführt, daß demzufolge Komponente 2 als ein universell einzusetzender "Immunolinker" bzw. immunologischer Linkerbaustein zu verstehen ist, dem die Funktion zukommt, eine mit mindestens einer Determinanten (Ha_2 bzw. H_an) ausgestatteten bzw. verbundenen, beispielsweise haptenisierten, Komponente 3, wie oben definiert über eine mit iner bestimmten von Ha_2 bzw. Ha_n verschiedenen Determinanten Ha_1

ausgestatteten bzw. verbundenen, beispielsweise haptenisierten, monospezifischen Komponente 1, wie oben definiert, an einen Zielort (T), wie oben definiert, zielgerichtet zu transportieren. Das heißt, die Funktion des eigentlichen "targeting" wird von der Komponente 1 ausgeübt, welche Spezifität für den betreffenden Zielort besitzt, an dem ein Effekt gewünscht wird. Die Komponente 3 ist daher im engeren Sinn als Träger zu verstehen, der den gewünschten Effekt ermöglicht. Die der Erfindung zugrundeliegende Variabilität dieses Systems wird somit durch die Komponenten 2 und 3 ermöglicht, in dem beliebige Determinanten Ha_2 bzw Ha_n, welche verschieden sind, beispielsweise untereinander verschiedene Haptene, an Z gekoppelt und beliebige, mindestens bispezifische Reagenzien Y mit entprechenden anti-Ha_2 bzw. anti-Ha_n Spezifitäten miteinander nicht-kovalent binden können. Entscheidend hierbei ist, daß die einzelnen Determinanten so gewählt werden, daß sie untereinander verschieden sind.

Bevorzugt wird eine Kombinationspräparation, bei der X und Z mit Haptenen ausgestattete bzw. verbundene Reagenzien bzw. Mittel sind, bei der Y ein mindestens bispezifischer Antikörper ist, der anti-Ha_1 und anti-Ha_2 bzw. anti-Ha_n Spezifitäten aufweist und bei der Z ein mit mindestens einem Hapten Ha_2 ausgestattetes bzw. verbundenes biologisch, chemisch oder physikalisch wirksames oder detektierbares Mittel ist.

Insofern wird eine Kombinationspräparation bevorzugt, wobei eine mit einem Hapten Ha_1 verbundene bindungsspezifische Komponente 1 ein Reagenz mit spezifischen Bindungseigenschaften umfaßt, das es befähigt, an Zellen, Geweben oder spezifischen Strukturen des tierischen und menschlichen Körpers zu binden. Insbesondere umfaßt das Reagenz ein Protein vorzugsweise ein Immunoglobulin oder Antikörper oder einem Fragment oder Derivat davon oder einen beliebigen Liganden mit den oben genannten Bindungseigenschaften bzw. Spezifitäten für eine antigene Bindungsstelle, beispielsweise ein Lectin, oder Adhäsionsmoleküle, Cytokine oder Chemokine, von denen bekannt ist, daß sie Rezeptoren und andere Bindungstellen von Geweben, Zellen oder Strukturen des Körpers erkennen und dort spezifisch und zielgerichtet anlagern können.
Die zweite, mindestens bispezifische Komponente 2 umfaßt bevorzugt ein Mittel bzw. Reagenz mit mindestens bispezifischen Eigenschaften, insbesondere einen inerten Partikel oder ein Protein mit Spezifität für mindestens zwei Haptene, wobei das Protein ein Ligand sein kann, beispielsweise ein Immunoglobulin bzw.

Antikörper oder ein Lectin, oder aus einem beliebigen Linkermolekül, welches Bindungsspezifität für die gewünschten Haptene Ha_1, Ha_2 bzw. Ha_n aufweist, wobei mindestens eine Haptenerkennungsstelle komplementär ist für Ha_1, eine andere für Ha_2 oder eine weitere für Ha_n. Bevorzugt ist ein bispezifischer Antikörper mit anti-Ha_1 und anti-Ha_2 Spezifität, welcher mit mindestens zwei verschiedenen Haptenen reagieren kann, wobei ein Reaktionspartner das Hapten Ha_1, der andere Ha_2 ist, wobei Ha_1 und Ha_2 verschieden sind.

Als dritte Komponente 3 der erfindungsgemäßen Kombination kommt bevorzugt ein mit einem Hapten Ha_2 verbundenes Effektormolekül oder ein Reportermolekül in Betracht, vorzugsweise ein Antikörper, eine beliebige Markersubstanz, ein Enzym, eine radioaktive Substanz, ein Kontrastmittel, biologisch aktive Substanzen, ein cytostatisch, cytocidal oder cytotoxisch wirkendes Agens oder beliebige Substanzen und Antigene, sowie Adhäsionsmoleküle, Cytokine oder Chemokine, von denen beispielsweise bekannt ist, daß sie spezifische Bindungstellen an Zellen oder Strukturen des Körpers eines Säugetieres erkennen und dort spezifisch und zielgerichtet anlagern können.

Besonders bevorzugt wird eine Kombinationspräparation, bei der X ein mit einem Hapten Ha_1 ausgestattetes bzw. verbundenes Protein ist, bei der Y ein mindestens bispezifischer Antikörper ist, der anti-Ha_1 und anti-Ha_2 bzw. anti-Ha_n Spezifitäten besitzt, und bei der Z ein mit mindestens einem Hapten Ha_2 bzw. Ha_n ausgestattetes bzw. verbundenes biologisch, chemisch oder physikalisch wirksames oder detektierbares Mittel ist.

Ganz bevorzugt wird eine Kombinationspräparation, bei der X ein mit einem Hapten Ha_1 verbundener Antikörper ist, der mit einem Antigen als spezifische Bindungsstruktur reagiert, bei der Y ein bispezifischer Antikörper ist, der anti-Ha_1 und anti-Ha_2 Eigenschaften besitzt und bei der Z ein mit einem Hapten Ha_2, welches verschieden ist von Ha_1, verbundenes Enzym, eine radioaktive Substanz, ein Kontrastmittel, ein Fluoreszenzmolekül bzw. eine Markersubstanz ist, wenn die Kombinationspräparation, vorzugsweise *in vitro*, zu immmundiagnostischen, immunhistochemischen, immunhistologischen oder immuncytologischen Zwecken oder für Immunoassays verwendet werden soll.

Davon wiederum bevorzugt ist eine Kombinationspräparation wie oben angeführt, jedoch mit der Besonderheit, daß Z ein mit einem Hapten verbundenes Effektormolekül, ein Antikörper, eine radioaktive Substanz, eine biologisch aktive

Substanz, ein cytotoxisch, cytocidal, cytostatisch oder cytolytisch wirkendes Mittel ist, wenn die Kombinationspräparation, vorzugsweise *in vivo*, zu immuntherapeutischen oder prophylaktischen Zwecken oder bei der Prognose und Bestimmung von Krankheitszuständen verwendet werden soll.

Eine ganz besonders bevorzugte Kombinationspräparation besteht darin, daß X ein mit einem Hapten Ha_1 verbundener monoklonaler Antikörper ist und Y ein bispezifischer Antikörper ist, welcher anti-Ha_1 und anti-Ha_2 Eigenschaften hat, wobei Z wie oben definiert ist und mit einem Hapten Ha_2 verbunden ist.

Eine besondere, beispielhafte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Kombinationspräparation kann darin bestehen, daß Ha_1 von X ein Nitrophenylderivat (NP), insbesondere 2,4-Dinitrophenol (DNP), ist, und Ha_2 von Z ein Steroidhapten, beispielsweise Digoxigenin ($\Delta^{20:22}$-3β,12β14,21-Tetrahydroxynorcholensäurelakton) (DIG) und Y ein monoklonaler Antikörper mit anti-NP:anti-DIG Spezifität ist, insbesondere mit anti-DNP:anti-DIG Spezifität, und mit beliebiger Spezifität von X und beliebiger Funktion von Z im Umfang der oben beschriebenen Definition.

Eine weitere beispielhafte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen kann darin liegen, daß X ein Protein, beispielsweise KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) oder OKT3 Antikörper ist, welches mit DNP als Hapten Ha_1 verbunden ist, Y ein bispezifischer, monoklonaler Antikörper ist, der anti-DNP:anti-DIG Spezifitäten aufweist und wobei Z ein Enzym, ein Farbstoff oder eine T-Zelle ist, welche mit DIG konjugiert bzw. verbunden sind.

Erfindungsgemäß umfaßt wird aber auch die Verwendung eines mit mindestens bispezifischer Spezifität für mindestens zwei verschiedene Haptene ausgestatteten Mittels, gemäß der in Tabelle1 angegebenen Definition für Y bzw. gemäß Anspruch 2 und den davon abhängigen Unteransprüchen, zur Herstellung eines Kombinationspräparates zu Verwendung in der Immunologie für diagnostische, prophylaktische, therapeutische Zwecke und für Immunisierungen.

Ein noch weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der Kombinationspräparationen zur Herstellung eines Mittels für immundiagnostische Zwecke.

BNSDOCID: <WO___9808875A1_I_>

Ein zusätzlicher Asp kt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der Kombinationspräparationen zur Herstellung von Mitteln für immunhistochemische, immuncytochemische, immunhistologische Zwecke und für Immunassays.

Ein darüberhinaus zusätzlicher Aspekt ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen zum "Imaging", d.h. zum Dedektieren und Lokalisieren von Zellen und/oder Geweben *in vitro* und *in vivo*, die sowohl in normaler, nicht-pathologischer Form vorliegen können als auch maligen entartet oder durch andere pathologische Ereignisse und Prozesse spezifisch verändert sein können.

Als ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der Kombinationspräparationen zur Herstellung eines Mittels oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung, gegebenenfalls zusammen mit physiologisch verträglichen Trägern und Zusatzstoffen, zur Prognose und Bestimmung *in vitro* und *in vivo* von Krankheitszuständen in einem oder außerhalb eines Säugetierorganismus.

Ein darüberhinaus weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der Kombinationspräparationen zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, gegebenenfalls zusammen mit physiologisch verträglichen Trägern und Zusatzstoffen, für die Immuntherapie von malignen Tumoren.

Ein noch weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der Kombinationspräparationen zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, gegebenenfalls zusammen mit physiologisch verträglichen Trägern und Zusatzstoffen, für die Therapie von durch Viren, Bakterien, Pilzen oder Parasiten bedingten Infektionserkrankungen.

Ein zusätzlicher Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der Kombinationspräparationen zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, gegebenenfalls zusammen mit physiologisch verträglichen Trägern und Zusatzstoffen, für die Therapie von Entzündungserkrankungen.

Ein darüberhinaus zusätzlicher Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung d r Kombinationspräparationen zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, gegeben nfalls zusammen mit physiologisch

verträglichen Trägern und Zusatzstoffen, für die Therapie von Autoimmunerkrankungen und zur Immunsuppression.

Ein noch weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der Kombinationspräparationen zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, gegebenenfalls zusammen mit physiologisch verträglichen Trägern und Zusatzstoffen, für die akute Behandlung von Abstoßungsreaktionen.

Ein zusätzlicher Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der Kombinationspräparationen zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, gegebenenfalls zusammen mit physiologisch verträglichen Trägern und Zusatzstoffen, für die prophylaktische Behandlung von Tumor-, Entzündungs-, Infektions-, oder Autoimmunerkrankungen oder Abstoßungsreaktionen oder zur Verhinderung einer Exazerbation eines solchen bestehenden Krankeitszustandes.

Ferner umfaßt wird die Verwendung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, gegebenenfalls zusammen mit physiologisch verträglichen Trägern und Zusatzstoffen, für die Therapie und Prophylaxe von Erkrankungen, die mit Blutgerinnungsstörungen (pathologische Blutverklumpungen innerhalb eines Säugetierorganismus) einhergehen und die Fibrinolyse unterstützen oder erhöhen.

Außerdem ist ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung die Verwendung der Kombinationspräparationen zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, gegebenenfalls zusammen mit physiologisch verträglichen Trägern und Zusatzstoffen für die Immunisierung bzw. Vaccinierung von Tieren und Menschen, mit beispielsweise Tumorproteinen mittels modulierenden Antigenen, beispielsweise solchen auf ARC (Antigen Presenting Cells).

Erfindungsgemäß umfaßt wird aber auch die Verwendung einer Komponente mit mindestens bispezifischen Spezifitäten gemäß der Definition in Tabelle 1 (anti-Ha_1—Y—anti-Ha_2 bzw. anti-Ha_1—Y—anti-Ha_2), zur Herstellung eines in der Immundiagnostik und der Immuntherapie verwendbaren Mittels oder einer pharmazeutischen Präparation mit der funktionellen Eigenschaft eines Immunolinkers, insbesondere in der Immunhistochemie, der Immuncytologie, der

Immunhistologie, bei Immunassays sowie bei der Prognose, Prophylaxe und der Therapie von malignen Tumoren, von Entzündungskrankheiten, von Infektionserkrankungen, von Autoimmunerkrankungen, zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen, zur Erzielung einer Immunsuppression, zur Verhinderung einer Krankheitsexazerbation, zur Prognose oder zur Bestimmung eines Krankheitszustandes bzw. Krankeitsverlaufs.

Zusätzlich werden erfindungsgemäß demzufolge umfaßt pharmazeutisch Formulierungen und deren Verwendungen wie oben beschrieben, welche aus den Komponenten 1, 2 und 3 oder aus den Komponenten 1 und 2 oder welche nur aus Komponente 2 bestehen.

Weitere Aspekte der vorliegenden Erfindung umfassen Verfahren zur Bestimmung, ob Mittel mit biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften bei der *in vitro* oder *in vivo* Diagnostik bzw. Immundiagnostik, bei der Immuntherapie (einschließlich prophylaktischer Behandlungen) oder bei Immunisierungen, im Sinne der oben angegebenen Verwendungsmöglichkeiten, geeignete biologische, chemische oder physikalische Wirkungen entfalten können oder zeigen, die als potentielle Kandidaten in Betracht kommen, aber von denen die erwünschte Wirkung *a priori* nicht bekannt ist.

Noch weitere Aspekte der vorliegenden Erfindung umfassen Verfahren zum Screenen (Suchen, Durchtesten) einer Pluralität von Mitteln mit biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften für die Zwecke der *in vitro* oder *in vivo* Diagnostik bzw. Immundiagnostik, für die Immuntherapie (einschließlich prophylaktischer Behandlungen) oder für Immunisierungen, im Sinne der oben angegebenen Verwendungsmöglichkeiten, welche geeignete biologische, chemische oder physikalische Wirkungen entfalten können oder zeigen, die als potentielle Kandidaten in Betracht kommen, aber von denen die erwünschte Wirkung *a priori* nicht bekannt ist.

Weitere Aspekte der vorliegenden Erfindung betreffen die Verwendung eines Mittels bestehend aus einer Kombinationspräparation umfassend die Komponenten 1, 2 und 3 oder umfassend die Komponente 1 und 2 oder umfassend die Komponente 2 in einem der oben genannten Bestimmungs- oder Screening-Verfahren.

Darüberhinaus werden von der Erfindung Verfahren umfaßt zur Herstellung von in der *in vitro* und *in vivo* Immundiagnostik, für die Immunprophylaxe, für die Immuntherapie oder für die Immunisierung geeigneten, verwendbaren Mitteln bzw. pharmazeutischen Zubereitungen, wonach die Bereitstellung neuer Diagnostika, Immuntherapeutika bzw. Immunprophylaktika oder Vaccine ermöglicht wird.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Kit-of-parts, bestehend aus den Komponenten 1, 2 und 3 oder aus den Komponenten 1 und 2 oder bei dem die Komponente 1 Bestandteil ist gemäß den Ansprüchen bzw. gemäß der Definition für X, Y und Z in Tabelle 1.

Zusätzliche Aspekte der vorliegenden Erfindung sind in den Unteransprüchen dargestellt.

Es hat sich herausgestellt, daß die erfindungsgemäßen Kombinationspräparate gegenüber dem Stand der Technik wesentliche Vorteile aufweisen:
Da Komponente 1 (X-Ha_1 gemäß Tabelle 1), beispielsweise ein für ein targeting geeignetes monospezifisches Reagenz (beispielsweise ein spezifischer Antikörper) mit nur einer Determinante Ha_1, beispielsweise mit einem Hapten, gekoppelt (haptenisiert) werden muß, ändern sich seine Bindungseigenschaften nicht, wohingegen die direkte Kopplung von Makromolekülen an Antikörper nach dem Stand der Technik die Bindung eines betreffenden Antikörpers an den Zielort (beispielsweise eine Zelloberflächenstruktur oder ein Epitop eines Oberflächenrezeptors einer Zelle) nachteilig beeinflußt.
Da die Bindungseigenschaften des zentralen, mindestens bispezifischen Reagenz der Komponente 2 (anti-Ha_1—Y—anti-Ha_2 gemäß Tabelle 1) für definierte Kombinationen von Determinanten, beispielsweise eine Haptenkombination (gekoppelt an X und Z gemäß Tabelle 1) immer konstant bleiben, genügt es, die gleiche bindungspezifische Komponente 2 zur Bindungsvermittlung zwischen allen möglichen mit definierten Determinanten ausgestatteten, beispielsweise mit definiert haptenisierten Reagenzien (zum Beispiel ein Protein, ein Antikörper) als Zielobjekt (X—Ha_1, gemäß Tabelle 1) und allen mit definierten Determinanten ausgestattete Mittel (beispielsweise definiert haptenisierte Antigene) mit Effektor-, Marker oder Reporterfunktion (Ha_2—Z bzw. Ha_n—Z, gemäß Tabelle 1) zu benutzen. Jegliche aufwendige Neukonstruktion an beispielsweise bispezifischen

BNSDOCID: <WO___9808875A1_I_>

Antikörpern bei verschiedenen, gewünschten Neukombinationen hinsichtlich Effektorzellen, Marker- oder Reportersubstanzen, Enzymen, biologisch wirksamen Proteinen (z.B.Cytokine, Hormone) oder anderen Substanzen, die am Zielort Markierungen oder biologische, chemische oder physikalische Effekte verursachen sollen, entfällt.

Bisher mußte bei der Bereitstellung von Reagenzien, beispielsweise, Antikörperkonjugaten, nach dem Stand der Technik ein spezifischer Antikörper direkt mit dem entsprechenden Reagenz (Farbstoff, Enzym, Toxin usw.) konjugiert werden, sodaß entsprechend viele Einzelkonjugate hergestellt werden mußten, wenn verschiedene Effektorsysteme verwendet werden sollten. Demzufolge mußten aus jedem spezifischen Antikörper entsprechend viele vordefinierte Endprodukte bereitgestellt werden.

Mit den erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen wird die benötigte Zahl an Endprodukten drastisch erniedrigt und sie bringen zusätzlich den Vorteil einer bisher nicht vorhandenen Flexibilität für die Anwendungen von Immunreagenzien in der *in vitro* und *in vivo* Diagnostik als auch bei der Verwendung von Immunagenzien in der Prophylaxe, Therapie und bei Immunisierungen. Wenn die Determinanten Ha_1 und Ha_2 bzw. Ha_n beispielsweise Haptene sind, wird ein Anwender in die Lage versetzt, über die mindestens für zwei Haptene spezifische Komponente 2 (beispielsweise ein anti-Ha_1:anti-Ha_2 bispezifischer Antikörper) eine Vielzahl verschiedener Kombinationen von einerseits zielgerichteter Reagenzien der Komponente 1 (beispielsweise ein spezifischer Antikörper) und andererseits von verschiedenen Komponenten 3 (wobei Z definiert sein kann gemäß Tabelle 1), jeweils mit untereinander verschiedenen Haptenen haptenisiert, leicht, schnell, spezifisch, flexibel, stöchiometrisch (wenn die betreffenden Komponenten 1 und 3 jeweils die Haptene Ha_1 und Ha_2 in einem Molverhältnis von 1:1 aufweisen) und nicht zuletzt preiswert und maßgeschneidert für seine Bedürfnisse und Problemlösungen zu benutzen bzw. herzustellen.

Bisher hatte ein Anwender von beispielsweise konjugierten Antikörpern für die Verwendung bei den verschiedensten immunologischen Zwecken *in vitro* oder *in vivo* nur die Wahl, entweder ganz bestimmte, einzelne und fertige Konstrukte umständlich herzustellen oder sie einzeln kommerziell teuer zu erwerben, wenn bei gleicher Spezifität des Bindungsreagenzes (meist ein Antikörper) beispielsweise eine Markierung gewechselt werden sollte oder die Kopplung mit einem anderen

Effektorsystem gewünscht war. Bei den erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen entscheidet unmittelbar der Benutzer, welche Markierung eingesetzt werden soll, und er kann sich in kurzer Zeit, meist innerhalb weniger Minuten, das gewünschte Produkt im Sinne eines Baukastensystems selber herstellen. Hierbei ist es völlig unerheblich, ob das zu lösende Problem bei *in vitro*-Systemen (beispielsweise zu immundiagnostischen Zwecken, für Assays oder allgemein in Zellsystemen) oder bei *in vivo*-Systemen (im lebenden Säugetierorganismen, beispielsweise in der Immuntherapie) besteht.

Aufgrund dieser Vorteile können in einfacher Weise mit den erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen solche Mittel oder Substanzen, von denen bekannt ist, daß sie biologische, chemische oder physikalische Eigenschaften oder Wirkungen aufweisen, bestimmt oder identifiziert werden, die dann bei der *in vitro* und *in vivo* Diagnostik, bei der Immuntherapie bzw. Immunprophylaxe oder bei Immunisierungen in vorteilhafter Weise zur Anwendung kommen können. Ebenso sind die betreffenden Kombinationspräparationen in hervorragender Weise für ein Screening geeignet, um aus einer Vielzahl von potentiellen Kandidaten bzw. Mitteln, von denen bekannt ist, daß sie biologische, chemische oder physikalische Eigenschaften oder Wirkungen aufweisen, solche zu erfassen, die für die erfindungsgemäßen Zwecke geeignet erscheinen. Derartige potentielle Kandidaten werden weiter unten noch näher beschrieben.

Bedeutung erlangt die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen aber auch in Verfahren zur Herstellung von in der *in vitro* und *in vivo* Immundiagnostika zu verwendenden Mitteln als auch zur Herstellung von für die Immunprophylaxe, Immuntherapie und für Immunisierungen verwendbaren pharmazeutischen Präparationen. Es ist hierbei von besonderer Bedeutung, daß über derartige Verfahren, wie sie weiter unten und in den Ansprüchen näher beschrieben sind, diagnostische oder therapeutische Mittel als Verfahrensprodukte bereitgestellt werden können, die nach dem Stand der Technik nicht oder nur sehr umständlich oder nur durch Zufall erhalten werden können.
Bereits die oben kurz beschriebenen Vorteile der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen und ihre Anwendungen machen es dem Fachmann plausibel, daß mit der vorliegenden Errfindung auf besonders einfache und effiziente Weise Mittel und Verfahren bereitgestellt werden, um diagnostisch und

therapeutisch wertvolle Substanzen herzustellen und diese nach bekannten Methoden zu den jeweiligen Zwecken anzuwenden.

Auf diesen Feststellungen gründet die Universalität der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen und sie umfassen daher alle diejenigen Anwendungen, die im Stand der Technik für die in der Immunologie bisher verwendeten Reagenzien, beispielsweise für die herkömmlichen Antikörper-konstruktionen, beschrieben sind oder auf die in der hier vorliegenden Beschreibung exemplifiziert hingewiesen wird.

Die Vorteile der erfindungsgemäßen Kombinationspräparate lassen sich wie folgt kurz umrissen zusammenfassen:

- keine nachteilige Beeinflussung der bindungsspezifischen Komponente 1, z.B. ein Antikörper, durch Kopplungen desselben mit biologisch, chemisch oder physikalisch wirksamen oder detektierbaren Effektorsystemen bzw. Makromolekülen (Z gemäß Tabelle 1).
- Entfallen von Neukonstruktionen von mindestens bispezifischen Reagenzien im Falle von unterschiedlichem Einsatz von koppelbaren Mitteln bzw. Effektorsystemen, die gewünschte Effekte an bestimmten Zielorten ausüben sollen.
- Drastische Erniedrigung der gewünschten Endprodukte für die Verwendung in der Immunologie bei z.B. Diagnose, Therapie, Prophylaxe, Immunoassays oder Immunisierungen.
- Hohe Flexibilität des Systems, dadurch schnellere und leichtere Handhabung.
- Preiswerte Herstellung von individuell gewünschten Kombinationen.
- Universelle Anwendung für das gesamte Gebiet der Immunologie *in vitro* und *in vivo*.
- Universell einzusetzender Immunolinker (Komponente 2).
- Problemlose Anpassung an und Verwendung für etablierte und im Stand der Technik mit herkömmlichen immunologischen Mitteln vorgeschlagenen Lösungen *in vitro* und *in vivo* in der Diagnose, Therapie, Prophylaxe, bei Immunoassays oder bei Immunisierungen.
- Leichtes Identifizieren, Bestimmen oder Screenen von Mitteln, die diagnostisch und immuntherapeutisch (einschließlich der Prophylaxe und der Immunisierung) anwendbar sind.
- Leicht und effizient durchzuführende Verfahren zur Herstellung von Diagnostika, Therapeutika und Vaccinen.

Aufgrund der universellen Verwendbarkeit und der sehr breiten Anwendungsmöglichkeiten der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen im immunologischen Bereich *in vitro* und *in vivo*, ist die Auswahl der einzelnen Bestandteile der Komponenten, wie sie in Tabelle 1 dargestellt sind, völlig unkritisch und muß auch *a priori* nicht vorgegeben werden. Der Fachmann weiß, welche Bestandteile er für vorteilhaft erachtet und kann diese entsprechend seinen speziellen Bedürfnissen auswählen und anpassen. Insofern kann von bevorzugten, ganz bevorzugten oder ganz besonders bevorzugten Kombinationspräparationen nicht gesprochen werden, da der Grad der Bevorzugung eng zusammenhängt mit dem jeweiligen Zweck und Ziel der speziellen Anwendung, die der Fachmann zur Lösung einer bestimmten immunologischen Aufgabe durchführen möchte. Im Folgenden soll die breite Verwendbarkeit der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen weiter verdeutlicht werden und der Fachmann kann schon allein aus dieser näheren Beschreibung erkennen, daß er die für sich als notwendig betrachteten Komponenten und Bestandteile davon ohne weiteres im Sinne eines Baukastensystems zur Lösung seiner speziellen Probleme auswählen kann.

Die einzelnen Komponenten der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen und deren Herstellung sind dem Fachmann entweder bekannt und in der Literatur erschöpfend beschrieben oder er kann sie ohne weiteres anhand der der vorliegenden Beschreibung zugrundeliegenden Offenbarung herstellen.

Die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen sind gemäß der vorliegenden Beschreibung für scheinbar ganz verschiedene Anwendungsgebiete verwendbar. Es soll an dieser Stelle jedoch hervorgehoben werden, das die verschiedenen beschriebenen Anwendungsaspekte *in vitro* und *in vivo* in der Immundiagnostik, der Immunhistochemie, der Immunhistologie, der Immuncytologie, der Immuntherapie einschließlich der Prognose und Bestimmung von Krankheitszuständen eines Säugetierorganismus, der Immunisierung bzw. Vaccinierung und der prophylaktischen Verwendung insofern durch einen einzigen, einheitlichen erfinderischen Gedanken verbunden sind, als daß die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen in dem gesamten die Immunologie betreffenden Gebiet universell einsetzbar sind und daher das erfinderische Prinzip dieser Verwendungen als solches betrachtet werden muß. Dies kommt beispielsweise dadurch zum Ausdruck, daß eine Immuntherapie und eine vorherige Diagnose eines Krankeitszustandes, um die Art der Erkrankung zu erfassen, welche

mit weiteren Mitteln der *in vitro* Immundiagnostik (z.B. mittels eines Immunoassays oder über histologisch/cytologische Untersuchungen) konkretisiert werden kann, regelmäßig Hand in Hand geht und über die Auswahl der geeigneten therapeutisch oder prophylaktisch einzusetzenden der der Erfindung zugrundeliegenden Kombinationspräparationen entscheiden. Demzufolge können diese Anwendungsaspekte durch die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen miteinander verknüpfend umfasst werden. Analoges gilt, wenn nicht-biologische Systeme Grundlage immunologischer Untersuchungen sind. Die Einheitlichkeit kommt aber auch allein schon durch die universelle Anwendbarkeit der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen als solche zum Ausdruck.

Die hinsichtlich der in der vorliegenden Beschreibung benutzten Begriffe und Terminologien sollen als eine orientierende Übersicht wie folgt kurz definiert werden, obwohl sie dem Fachmann *per se* oder im Zusammenhang mit der vorliegenden Offenbarung verständlich sind, wenn nicht an anderer Stelle eine speziellere Erklärung oder Definition gegeben wird.

Der Begriff "Reagenz" umfaßt Verbindungen oder Stoffe, die mit einem Partner eine bevorzugt nicht-kovalente Bindung eingeht. Insbesondere wird hinsichtlich Y gemäß Tabelle 1 darunter ein mindestens bispezifisches Mittel verstanden, welches mit mindestens einem mit mindestens einer definierten spezifischen, immunologisch reaktiven Determinante Ha_1 ausgestatteten bzw. verbundenen Mittel (X) oder mit mindestens einer definierten spezifischen, immunologisch reaktiven Determinante Ha_2 bzw Ha_n ausgestatteten bzw. verbundenen Mittel (Z) als entsprechende Reaktionspartner nicht-kovalent bindet, beispielsweise im Sinne einer Antigen-Antikörper Reaktion. Insofern können die Komponenten 1, 2 und 3 als Reagenzien betrachtet werden, die miteinander nicht-kovalent reagieren.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung sind unter "definierten spezifisch, immunologisch reaktiven Determinanten" spezifische, für ein Reagenz (Komponente 2) erkennbare biologische Strukturen zu verstehen, an die dieses Reagenz aufgrund seiner Spezifitäten spezifisch nicht-kovalent binden kann, und mit denen die entsprechenden Reaktionspartner, beispielsweise ein Protein, ausgestattet bzw. an denen sie gebunden sind. Unter solche Strukturen fallen beispielsweise oberflächenspezifische antigene Strukturen (antigene Determinanten) von Zellen oder Bestandteilen davon, partikuläre Antigene, Epitope, Paratope, Idiotope oder Haptene.

BNSDOCID: <WO__9808875A1_I_>

Als "Agens" wird eine Wirkstoffverbindung verstanden, die eine therapeutische oder prophylaktische (verhütende) oder hemmende Wirkung *in vivo* oder *in vitro* entfaltet (Effektorfunktion), oder eine Marker- oder Reporterfunktion aufweist. Insbesondere ein Mittel gemäß der Definition für Z gemäß Tabelle 1.

Unter dem Begriff "Hapten" werden niedermolekulare Substanzen subsummiert, die für sich selbst keine Antikörperreaktionen verursachen, aber nach Bindung an ein Immunogen eine Immunreaktion auslösen können, wobei gegen diese gerichtete Antikörper gebildet werden.

Der Begriff "monospezifisches Reagenz" oder "bindungsspezifische Komponente" umfaßt ein Mittel gemäß der Definition für X in Tabelle 1, welches in der Lage ist, zielgerichtet an einen definierten Ort bzw. an eine "target structure" bzw. an "target cells" nicht-kovalent zu binden (als "targeting" bekannt), wobei der definierte Ort eine Zielzelle oder ein Teil davon, ein partikuläres Antigen bzw. ein Immunogen sein kann. Im Falle eines Reagenzes, welches in diesem Sinn nicht monospezifisch ist, werden damit beliebige Mittel, beispielsweise Proteine (zum Beispiel Keyhole Limpet Hempcyanin, KLH) umfaßt, an die eine bestimmte Determinante der oben angegebenen Definition gebunden ist.

Der Begriff "mindestens bispezifische Komponente" bzw. "mindestens bispezifisches Reagenz" umfaßt Reagenzien und Agenzien, die Bindungsspezifitäten gegen verschiedene definierte spezifische, immunologisch reaktive Determinanten besitzen (Y in Tabelle 1), beispielsweise mit anti-Hapten Spezifitäten.

Mit "bindungsspezifischen Strukturen des tierischen und menschlichen Körpers" bzw. "spezifische biologische Bindungsstrukturen" werden solche Strukturen innerhalb und an der Oberfläche von Zellen, Geweben und Organen umfaßt, die im immunologischen Sinn als Antigene, Epitope bzw. antigene Determinanten bezeichnet werden oder Rezeptorbindungsstellen oder Bindungsstellen für Adhäsionsmoleküle umfassen und an die spezifische Antikörper, rezeptorbindende Stoffe, Adhäsionsmoleküle usw. sowie Derivate und Fragmente davon oder antikörperähnliche Stoffe (wie zum Beispiel Lectine, mit spezifischen Strukturen ausgestattete inerte Partikel) zu binden vermögen. Insofern steht der Begriff "bindungsspezifische Strukturen des tierischen und menschlichen Körpers" bzw. "spezifische biologische Bindungsstrukturen" als Oberbegriff summarisch für definierte Zelloberflächenstrukturen, Antigene, Epitope, Rezeptoren, Adhäsionsmolekülbindungsstellen oder Teilen von den genannten Strukturen, sowie Zuckerreste, Drogen oder Toxine.

Als "Antigene" werden natürlich vorkommende oder chemisch synthetisierte Moleküle verstanden, die spezifisch von gegen diese Antigene gerichtete Antikörper bzw. Immunglobuline nicht-kovalent gebunden werden. Antigene mit Immunsystem-aktivierenden Eigenschaften, welche die Antikörpersynthese induzieren, werden als "Immunogene" bezeichnet.

Der Begriff "Epitop" umfaßt diskrete Bereiche auf einem Makromolekül (zum Beispiel ein Protein), welche die Antikörpersynthese auslösen und gegen die spezifische Antikörper synthetisiert werden bzw. mit denen Antikörper spezifisch reagieren können, wobei diese an das betreffende Epitop (bzw. die antigene Determinante) nicht-kovalent binden.

Unter "Lectinen" versteht der Fachmann Proteine bzw. Liganden mit zwei oder mehreren Bindungsstellen für ganz spezifische Zuckerreste auf Glykoproteinen und Glykolipiden an Zelloberflächen, wodurch diese, ähnlich wie Antikörper, die entsprechenden Moleküle kreuzvernetzen können und auch an entsprechend mit einer Determinante ausgestatteten bzw. verbundenen, beispielswiese haptenisierten, Bindungspartner zu binden vermögen.

Als "inerte Partikel" werden solche Partikel umfaßt, die keinerlei körpereigene Immunreaktion auszulösen vermögen, an die aber Haptene, Antigene oder Epitope bzw. antigene Determinanten gebunden ("gecoatet") werden können und darüber spezifisch mit entsprechenden bindungsspezifischen Strukturen und Komponenten als Reaktionspartner analog wie Antikörper reagieren können.

Mit "Linkermolekülen" sind chemisch synthetisierte Verbindungsmoleküle gemeint, die kovalent oder nicht-kovalent zwei Proteine, insbesondere Antikörper, Derivate oder Fragmente davon zu Heteroaggregaten verbinden können. Insbesondere werden damit hetero- und/oder homobifunktionelle Verbindungen umfaßt, beispielsweise solche, die mit ε-Aminogruppen oder mit SH-Gruppen (beispielsweise der "hinge" Region) von Antikörpern reagieren, oder die Thiole an Fab Fragmente aktivieren. Umfaßt werden aber auch andere Linkermoleküle, die Biomoleküle mit weiteren Stoffen verbinden können, beispielsweise das Avidin - Biotin-System oder das Streptavidin-Biotin-System.

Unter "Effektormoleküle" werden solche bekannten Mittel, Moleküle, Verbindungen oder Partikel biologischen oder nicht-biologischen Ursprungs umfaßt, die am Zielort Wirkung, insbesondere therapeutische Wirkung, entfalten oder vermitteln, wie beispielsweise lytische, cytostatische, cytocidale, cytotoxische, fibrinolytische, immunsuppressive, entzündungshemmende, infektionshemmende oder immunisierende Wirkung. Insbesondere v rmittelt durch biologisch aktive

BNSDOCID: <WO___9808875A1_I_>

Substanzen, wie beispielsweise Antigene (zum Beispiel Hormone, Enzyme, Cytokine oder modulierende Antigene auf antigen-präsentierenden Zellen, beispielsweise HLA-Klasse II) oder Effektorzellen (zum Beispiel T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen) oder durch geeignete radioaktive Stoffe bzw. Isotopen insbesondere β- und γ-Emitter, beispielsweise ^{99m}Tc, ^{111}In, ^{131}J, ^{123}J, ^{90}Y, ^{186}Re.

Der Begriff "Reportermolekül" umfaßt solche bekannte Mittel, die geeignet sind, an organischen bzw. biologischen Strukturen (Zellen und Gewebe und Bestandteilen davon, Toxine, Antigene, usw.) oder Teilen davon ein detektierbares Signal auszulösen oder ein solches Signal zu bedingen, beispielsweise durch Markersubstanzen wie zum Beispiel Farbstoffe, Fluoreszenzstoffe (beispielsweise Fluoresceinisothiocyanat), Enzym (beispielsweise Luciferase), Konstrastmittel (beispielsweise ein paramagnetisches Kontrastmittel), Radioisotope beispielsweise der Halogene, des Technetiums, Bleis, Thalliums, Indiums oder Quecksilbers, wie zum Beispiel ^{125}I, ^{123}I, ^{131}I, ^{111}In, ^{99m}Tc, ^{203}Pb, ^{201}Tl, ^{198}Hg, ^{90}Y, ^{186}Re.

Um eine noch genauere Beschreibung zu geben, sind im Sinne der vorliegenden Erfindung unter dem Begriff "Immunglobuline" oder synonym dafür "Antikörper", mindestens bispezifische bivalente bzw. polyvalente, monoklonale Antikörper zu verstehen, insbesondere der Isotypen IgG, IgM, IgA, IgE und IgD und deren Unterklassen und Derivate davon, aber auch solche, die Fragmente davon darstellen und Derivate davon, einschließlich solcher, die die idiotypische Region des Antikörpermoleküls enthalten, insbesondere solche, die die Fv-Region enthalten, beispielsweise die $F(ab)_2$ und Fab Fragmente, aber auch a priori chimäre Antikörper oder Hybridantikörper mit mindestens zwei Antigen- bzw. Epitopbindungsstellen, oder bispezifische rekombinante Antikörper (beispielsweise "Double-single-chain" Antikörper, Diabodies), anti-idiotypische Antikörper und solche davon, die chemisch modifiziert wurden und als Derivate dieser Antikörper zu verstehen sind und die entweder über DNA-Rekombination, mittels Hybridomatechnik oder Antikörper-Engineering oder synthetisch oder semisynthetisch nach an sich bekannten Verfahren herstellbar sind und die bekannten und beschriebenen Reaktionseigenschaften hinsichtlich der dem Fachmann bekannten und beschriebenen Methoden der Immunologie aufweisen.

Aus der vielfältigen Literatur über die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern und Derivaten davon sei nur beispielhaft hingewiesen auf Arbeiten von KÖHLER, G. & MILSTEIN, C., Nature 256, 495 - 497,1975; BIOCCA, S. et al., EMBO J. 9, 101

BNSDOCID: <WO___9808875A1_I_>

- 108, 1990; BIRD, R. E. et al. Science 242, 423 - 426, 1988; BOSS, M. A. et al. Nucl. Acids Res. 12, 3791 - 3806, 1984; BOULIANNE, G. L. et al., Nature 312, 643 - 646, 1984; BUKOVSKY, J. & KENNETT, R. H., Hybridoma 6, 219 - 228, 1987; DIANO, M. et al., Anal. Biochem. 166, 223 - 229, 1987; HUSTON, J. S. et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879 - 5883, 1988; JONES, P. T. et al., Nature 321, 522 - 525, 1986; LANGONE, J. J. & VUKANIS, H. V. (Hrsg), Methods Enzymol. 121, Academic Press, London, 1987; MORRISON, S. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851 - 6855, 1984; OI, V. T. & MORRISON, S. L., BioTechniques 4, 214 - 221, 1986; RIECHMANN, L. et al., Nature 332, 323 - 327, 1988; TRAMONTANO, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 6736 - 6740, 1986; WOOD, C. R. et al., Nature 314, 446 - 449, 1985; BRILES, D. E. & KEARNEY, J. F., Methods in Enzymology 116, 174 - 189, 1985.
Mitumfaßt sind auch humanisierte Antikörper oder CDR-grafted Antikörper, beispielsweise gemäß GÜSSOW, D. & SEEMANN, G., Methods in Enzymology 203, 99 - 121, 1991, oder gemäß EP-A 0239 400, WO 92/05274 oder WO 92/15683, und Diabodies beispielsweise gemäß HOLLIGER, P. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444 - 6448, 1993.

Monoklonale Antikörper, die die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen ganz bevorzugt enthalten können, können durch jede beliebige, bekannte Technik erhalten werden, die für die Herstellung von Antikörpern über Kultivierung von Zellinien zur Verfügung stehen. Zu derartigen bekannten Techniken zählen beispielsweise die von KÖHLER, G. & MILSTEIN C., 1975, loc. cit., oder TAGGART & SAMLOF, Science 219, 1228 - 1230, 1983, beschriebenen Verfahren mit Hybridomazellen oder solche mit B Zell Hybridomen (KOZBOR et al. Immunology Today 4, 72 - 79, 1983) oder mittels Hybrid Hybridoma (TAKAHASHI, M et al., Methods in Enzymology, 203, 312 - 327, 1991).
Alternativ kommen natürlich auch kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper in Frage, beispielsweise solche, wie sie in der EP-A 0 466 637, Seiten 4 bis 6, einschließlich deren kommerziellen Bezugsquellen, genannt werden und das X in Komponente 1 Verwendung finden können.

Hinsichtlich der Herstellung von polyklonalen Antikörpern, stehen ebenfalls eine Anzahl bekannter Verfahren zur Verfügung. Es können z.B. für diesen Zweck in an sich bekannter Weise verschiedene Tiere durch Injektion mit einem geeigneten bzw. gewünschten Antigen, welches natürlichen Ursprungs, über DNA-

Rekombination oder synthetisch bzw. semisynthetisch hergestellt sein kann, oder Teilen davon, immunisiert werden und aus den danach gewonnenen Seren bzw. Blutproben die gewünschten polyklonalen Antikörper nach an sich bekannten Methoden gewonnen und gereinigt werden. Bevorzugte Antigene sind solche, die von Viren, Prokaryonten und Eukaryonten abstammen bzw. solche darstellen. Die Methoden der Herstellung polyklonaler Antikörper beispielsweise über Immunisierung eines Tieres sind dem Fachmann bekannt und sind beispielsweise beschrieben in "Practical Immunology", Hudson, L. & Hay F. C. (eds.), Third Edition, Blackwell Scientific Publications, 1989.

Als Alternative können auch intakte Zellen benutzt werden. Verschiedene Adjuvantien zur Erhöhung der gewünschten Immunantwort auf die Antigen Exposition können, abhängig von dem für die Immunisierung ausgewählten Tier, ebenfalls verwendet werden - beispielsweise komplettes Freund's Adjuvant, Mineralgele wie z.B. Aluminiumhydroxid, oberflächenaktive Substanzen wie z.B. Polyanionen, Peptide, Ölemulsionen, Hemocyanine, Dinitrophenol oder Lysolecthin.

Bevorzugt werden jedoch Antikörper, insbesondere monoklonale Antikörper, Fragmente oder Derivate davon.

Bispezifische Antikörper können über prinzipiell drei verschiedene Verfahren hergestellt werden.

Eine der früheren Methoden umfaßt die Fusion von zwei Hybridomazellen zu Tetradomen (MILSTEIN, C, & CUELLO, A. C. Nature 305, 537 - 540, 1983). Die Herstellung eines bispezifischen Antikörpers kann demgemäß beispielsweise dadurch erfolgen, daß eine geeignete Anzahl parentaler Hybridomazellen (ca. 10^6 bis 10^7), die sensitiv gemacht werden, beispielsweise für Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT), durch entsprechende Selektion auf eine Hypoxanthinphosphoryltransferase negative Variante. Diese werden in einem geeigneten Verhältnis (zum Beispiel 1:1 bis 10:1) mit den zweiten parentalen Hybridomazellen fusioniert. Die zweiten parentalen Hybridomazellen werden dafür vorher vorzugsweise mit einer lethalen Menge eines geeigneten cytocidalen Reagenz (zum Beispiel 10mM Jodacetamid) vorbehandelt. Die Fusion selbst kann dabei in Gegenwart eines polyfunktionellen Alkohols erfolgen, beispielsweise in einer Lösung von Polyethylenglykol (PEG, ca. 50% w/v). Das überschüssige PEG wird entfernt und die Zellen werden wie üblich ausplattiert in einer Konzentration von ungefähr 10^5 bis 10^7 Zellen/ml in einem geeigneten, gepufferten Medium

(beispielsweise Bicarbonat gepuffertes Dulbecco Medium, oder RPMI 1640 Medium, gegebenenfalls supplementiert mit einem S rum, insbesondere fetalem Kälberserum (ca. 5% v/v)). Nach Kultivieren der Zellen bei beispielsweise 37° C können die Hybridoma in einem geeigneten Medium selektiert werden.

Grundsätzlich führt die Verschmelzung von zwei Hybridomzellen zu Tetradomen (so genannt aufgrund der Abstammung aus insgesamt vier Ursprungszellen), welche zu antikörperproduzierenden Zellen führt, die bispezifische Moleküle sezernieren, die den natürlich vorkommenden Immunglobulinen in Struktur und Größe vergleichbar sind. Technisch wird dabei ähnlich wie bei der Herstellung von Hybridomen vorgegangen. Zunächst wird eine der zu hybridisierenden Hybridomzellen auf Sensitivität, beispielsweise auf HAT-Sensitivität, selektiert. Dies wird durch Kultivieren der Zellen in Medium mit ansteigenden Konzentrationen an beispielsweise 8-Azaguanin induziert und bedeutet, daß der entstehende Zellklon einen genetischen Defekt, beispielsweise für das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) aufweist, und damit nicht in Zellkulturmedien wächst, die Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthalten (HAT-Medium). Das andere Hybridom kann entweder gegen einen anderen biologischen Stoff sensibilisiert oder zum Beispiel mit Iodoacetamid irreversibel inaktiviert werden. Nach der Fusion der elterlichen Hybridome, können dann im HAT-Medium nur solche Hybridome wachsen, die die genetische Information beider elterlicher Hybridome enthalten. Nach Subklonierung erfolgt dann die Etablierung stabiler Tetradomzellinien, die einen möglichst hohen Anteil bispezifischer Moleküle sezernieren. Derartige bispezifische Moleküle können als Komponente 2 Verwendung finden.

Eine andere Möglichkeit zur Herstellung von Tetradomen ist die Möglichkeit der Oberflächenmarkierung der zu fusionierenden Zellen mit unterschiedlichen fluoreszierenden Farbstoffen, und der Sortierung von doppelgefärbten Zellen nach der Hybridisierung mit Hilfe der Durchflußzytometrie (FACSort, "fluorescent activated cell sorting").

Die entstehende Tetradomzelle enthält also das Genmaterial beider ursprünglicher Hybridomzellen und damit die Information zur Bildung der vier elterlichen schweren bzw. leichten Antikörperketten. Nach stochastischer Reassoziierung ergeben sich insgesamt zehn Kombinationsmöglichkeiten der jeweils schweren und leichten Ketten. Von diesen stellen jedoch lediglich drei in funktioneller Hinsicht korrekte Antikörpermoleküle dar, in denen die Bindungsstellen der Molekülhälften aus

Schwer- und Leichtkette desselben elterlichen Hybridoms stammen. Hierbei handelt es sich um die beiden elterlichen (monospezifischen) Antikörper, sowie den neugeformten bispezifischen Antikörper, dessen Hälften aus schwerer und leichter Kette jeweils aus einem elterlichen Hybridom stammen. Die restlichen sieben Kombinationsmöglichkeiten, sogenannte "mismatches", stellen funktionell fehlerhafte Immunglobuline dar, die jedoch durch die meistbevorzugte Assoziation der schweren und leichten Kette desselben elterlichen Antikörpers in weitaus geringerem Maße entstehen. Der Anteil der korrekt sezernierten bispezifischen Antikörper im Tetradomprodukt kann bei den verschiedenen Zellinien zwischen 5% und 50% des insgesamt produzierten Immunglobulins variieren. Da bei der späteren Aufreinigung der bispezifischen Antikörperfraktion in der Regel eine Differenzierung über die proteinchemischen Eigenschaften der konstanten Teile der schweren Kette erfolgt, ist schon bei der Fusion darauf zu achten, daß Hybridome miteinander kombiniert werden, die vorzugsweise Immunglobuline unterschiedlicher Isotypen sezernieren. So ist zum Beispiel bei der Verwendung von gegen menschliche Antigene gerichtete Mausantikörper die Kombination der Isotypen IgG_1 und IgG_{2a} sowie IgG_1 und IgG_{2b} im Hinblick auf die spätere Differenzierung zwischen elterlichen und bispezifischen Antikörpern besonders geeignet.

Um eine Differenzierung innerhalb der trotz Monoklonalität heterogenen Immunglobulinfraktion zu erreichen, können vorzugsweise im Anschluß an eine Affinitätschromatographie weitere Aufreinigungsverfahren angeschlossen werden. Hier bieten sich zusätzliche chromatographische Reinigungsschritte, beispielsweise die Ionenaustausch- und die hydrophobe Interaktionschro-matographie, an, wobei sich letztere auch ohne vorherige Immunglobulinanreicherung durchführen läßt, da in einem einzigen Chromatographieschritt sowohl Differenzierung zwischen Immunglobulinen und anderen Proteinbestandteilen des Zellkulturmediums, als auch ausreichende Separierung innerhalb der Antikörperfraktion, erfolgen kann. Aber auch andere Isolationsverfahren wie beispielsweise die elektrophoretische Auftrennung mittels isoelektrischer Fokussierung, die die unterschiedlichen isoelektrischen Punkte der elterlichen und bispezifischen Antikörper zur Differenzierung benutzen, können erfolgreich angewendet werden.

Die über die oben beschriebenen, aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren zur Präparationen von bispezifischen Antikörpern kommen für Komponente 2 in Betracht, wie auch die anderen Präparationsverfahren, die zu bispezifischen Molekülen führen.

BNSDOCID: <WO__9808875A1_I_>

Aber auch über DNA-Rekombination hergestellte Antikörper (sog. Engineered Antibodies) werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung mitumfaßt, beispielsweise solche, die nach den beschriebenen Verfahren gemäß COLOMA, M. J. et al., J. Immunol. Methods 152, 89 - 104, 1992; "Methods in Enzymology" 178, 1989 oder EP-A 0 125 023 produziert werden können.

Beispielsweise kann ein bispezifischer Antikörper nach diesem Verfahren dadurch erhalten werden, daß einzelkettige Proteine aus V_L und V_H Domänen der Antikörper (Fv) mit dem C-Terminus der einen Domäne und dem N-Terminus der anderen Domäne verbunden werden (BIRD, R.E. & WALKER, B. W., Trends in Biotechnol. 9(4), 132, 1991). Zu einem vergleichbaren Fusionsprotein mit bispezifischen Eigenschaften (zum Beispiel CD4:Fcγ oder CD4:CD3) führt das Verfahren von TRAUNECKER, A. et al., EMBO J. 10(12), 3655, 1991, und von BRYN, R. A. et al., Nature 344, 667 - 670, 1990). Ein weiterer bispezifischer (Fusions-) Antikörper kann nach dem gentechnischen Verfahren gemäß ASHKENAZI, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88(23), 10535 - 10539, 1991, hergestellt werden. In diesem Fall betraf das Fusionsprotein ein Immunglobulin (Immunoadhäsion), welches Entzündungen dadurch hemmt, daß es mit einem anderen Adhäsionsmolekül interferierte. Von DEMONTE, L. B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(8), 2941 - 2945, 1990, wird ein Gentransfer über retrovirale Shuttle-Vektoren zur Herstellung bispezifischer Antikörper vorgeschlagen. Eine weitere Methode, bispezifische Antikörper herzustellen, besteht darin, daß über einen "Leucin-Reißverschluß" ("leucine-zipper") bestimmte Transkriptionsfaktoren (Jun und Fos) genetisch mit anti-Tac bzw. anti-CD3 Fab_2' Regionen fusioniert werden. Die bispezifischen Antikörper werden dann durch Zusammenmischen beider Konstrukte gebildet (KOSTELNY, S. A. et al., J. Immunol. 148, 1547 - 1553, 1992).

Über gentechnologische Methoden herstellbar sind auch kleine Antikörperfragmente mit zwei antigenen Bindungsorten, sog. "Diabodies", welche für die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen ebenfalls in Betracht kommen. Derartige Fragmente, welche aus einer variablen Domaine der schweren Kette (V_H) bestehen, die mit einer variablen Domäne der leichten Kette (V_L) an der selben Proteinkette verbunden sind (V_H—V_L) können beispielsweise gemäß HOLLIGER, P. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444 - 6448, 1993, hergestellt werden. Diabodies stellen ähnlich den single-chain-Antikörpern nach bekannten Methoden genetisch konstruierte Proteine dar. Die Bindungssequenzen der schweren und der

BNSDOCID: <WO___9808875A1_I_>

leichten Ketten der (Maus-) Immunolglobuline können nach bekannten Verfahren in Bakteriensystemen exprimiert werden, wobei in der Gensequenz der variable Teil der schweren Kette (V_H1) des einen Antikörpers an die Sequenz der leichten Kette (V_L2) des anderen Antikörpers und *vice versa* (V_H2/V_L1) insertiert werden kann. Das Bakterienprodukt kann sich dann derart falten, daß die Bindungsstellen V_H1 und V_L1, sowie V_H2 und V_L2 in funktionell korrekter Stellung zueinander zu liegen kommen und damit ein bispezifisches Molekül entstehen kann, welches vergleichbare Bindungsaffinitäten wie ein natürlicher Antikörper aufweist, gleichzeitig aber nur aus den variablen Domainen der ursprünglichen Immunoglobuline besteht und somit nur wenig immunogen im humanen System wirken kann.

Die Expression von Antikörperfragmenten in Bakterien gehört zum Stand der Technik, sodaß derartige rekombinante Antikörperfragmente-Hybridome als die Hauptquelle von bispezifischen Antikörpern für medizinische (Prophylaxe, Therapie, Immunisierungen) und diagnostische Anwendungen im Sinne der vorliegenden Erfindung vorteilhaft in Betracht kommen. Antikörperfragmente haben nämlich gegenüber vollständigen Antikörpern Vorteile, beispielsweise die einer billigeren Produktion in Mikroorganismen oder Zellkulturen (beispielsweise Bakterien, Säugetierzellen) und, auf Grund eines geringeren Molekulargewichts, eine bessere Penetration von beispielsweise Körpergeweben und Tumoren.

Da Diabodies bispezifisch sein können, können diese vorteilhaft als Komponente 2 (Y) verwendet werden. Demzufolge kann eine derartige Komponente 2 zwei Bindungsstellen (anti-Ha_1 und anti-Ha_2) auf demselben Molekül besitzen: eine zum Binden an eine entsprechende Determinante Ha_1 auf einem Zielantigen (beispielsweise einem Tumormarker), eine andere an eine entsprechend verschiedene Determinante Ha_2 auf beispielsweise einer Effektorzelle des Immunsystems, sodaß letztere auf diese Weise zum Zielgewebe (zum Beispiel ein Tumor) transportiert wird. Auf diese Weise kann die erfindungsgemäße Kombinationspräparation unter Benutzung von Diabodies beispielsweise zum Abtöten von Killer-T-Zellen aktivierten Tumorzellen verwendet werden.

Diabodies können aber nicht nur Killer-T-Zellen aktivieren: durch Variation der Effektorbindungstelle läßt sich eine ganze Palette von Immuneffektorfunktionen, wie beispielsweise Komplement-Aktivierung oder Antikörper-aktivierte Zellyse, aktivieren.

Vorteilhaft für die Benutzung von Diabodies ist ihre Reinigung über einen einzigen Chromatographieschritt.

Insofern sind Diabodies für den Zweck der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen, insbesondere für Komponente 2, vorteilhaft zu verwenden.

Bispezifische Antikörper können aber auch über chemische Wege hergestellt werden, wobei verschiedene Verfahren bekannt sind. Beispielsweise können gemäß KARPOVSKY, B. et al., J. exp. Med. 160, 1686, 1984, Heterokonjugate ("hetero-cross-linked-aggregates") hergestellt werden oder es kann nach dem Verfahren gemäß GLENNIE, M. J. et al., J. Immunol. 139, 2367 - 2375, 1987, vorgegangen werden, wonach bispezifische $F(ab'\gamma)_2$ Antikörper über Thioether-verbundene Fab'γ Fragmente mittels *o*-Phenylendimaleimid konstruiert werden. Die Präparation von bispezifischen Antikörpern kann auch durch chemische Rekombination von Fragmenten monoklonaler Antikörper erfolgen (BRENNAN, M. et al., Science 229, 81 - 83, 1985). In solch einem Fall werden die Fc' Anteile des betreffenden Antikörpers (zum Beispiel IgG) unter milden Bedingungen durch limitierte Pepsinhydrolyse (beispielsweise 2% w/w Pepsin in 0,1 M Natriumacetat, pH 4,2, 18 Stunden, 37°C) entfernt und $F(ab')_2$ Teile erhalten. Reduktion der $F(ab')_2$ Fragmente mit Mercaptoethylamin (zum Beispiel 1 mM) in Natriumphosphat oder Natriumarsenit (beispielsweise 0,1 M, pH 6,8), und EDTA (zum Beispiel 1 mM) bei 25°C für 18 Stunden, führt zur Umwandlung von $F(ab')_2$ zu Fab'. Vorzugsweise wird diese Umwandlung mit einem Dithiolkomplexierungs-Agens durchgeführt. Bevorzugt werden die freien Thiole, nachdem mit Natriumarsenit verhindert wird, daß sich intermolekulare S-S-Bindungen ausbilden, mittels eines geeigneten, die Thiolgruppen aktivierenden Reagenz, stabil derivatisiert. Beispielsweise durch Reaktion mit Ellman's Reagenz (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoesäure)). Eines der dabei entstehenden Fab'-Thionitrobenzoat (TNB)-Derivate wird anschließend durch Reduktion mit 2-Mercaptoethylamin in die Fab'-Thiole umgewandelt und mit äquimolaren Mengen Fab-TNB gemischt, wodurch sich die gewünschten bispezifischen Antikörper bilden.

Hinsichtlich zweier oder mehrerer distinkter Proteine, die durch ein Linkermolekül miteinander chemisch kovalent verbunden sind und dadurch mindestens bispezifischen Charakter erhalten, insbesondere wenn Y gemäß Tabelle 1 zwei oder mehrere distinkte, miteinander verbundene Antikörper bedeuten, sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung alle dem Fachmann bekannten Moleküle oder "Crosslinkers" oder "Cross-Linking-Reagents" zu verstehen, mit denen mindestens

BNSDOCID: <WO___9808875A1_1_>

zwei gleiche oder verschiedene Proteine oder Peptide nach an sich bekannten Methoden miteinander kovalent verbunden werden können. Unter dem Begriff "Crosslinkers" oder "Cross-Linking-Reagents" werden solche Moleküle mit den genannten Eigenschaften verstanden, welche funktionelle Gruppen enthalten, die an Aminosäureresten in Proteinen und Peptiden binden. Demzufolge werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung alle Crosslinker bzw. Cross-Linking-Reagentien umfaßt, die intermolekulare kovalente Bindungen zwischen zwei Proteinen oder Teilen davon erzeugen können. Im weiteren wird daher nur noch von "Verbindungsmolekülen" gesprochen, wenn von derartigen Crosslinkern oder Cross-Linking-Reagentien die Rede ist.

Erfindungsgemäß bevorzugt werden insbesondere solche Verbindungsmoleküle, deren reaktive Gruppen gleich (homobifunktionelle Verbindungsmoleküle) oder verschieden (heterobifunktionelle Verbindungsmoleküle) sind.

Aus der Gruppe der homobifunktionellen Verbindungsmoleküle kommen solche in Betracht, die vorzugsweise mit primären Aminen (aminreaktiv) oder mit Sulfhydrylgruppen (thiolreaktiv) reagieren, beispielsweise Imidoester bzw. Maleimide, Alkylhalide, Arylhalide, α-Haloacyle, Pyridyldisulfide.

Bei den heterobifunktionellen Verbindungsmolekülen, die mindestens zwei verschiedene reaktive Gruppen besitzen, sind insbesondere solche geeignet, die eine aminoreaktive funktionelle Gruppe an einem Ende und eine sulfhydrylreaktive Gruppe am anderen Ende besitzen, beispielsweise solche, die als eine erste Gruppe eine N-hydroxysuccinimidester Gruppe und als eine zweite funktionelle Gruppe eine Maleimidgruppe besitzen.
Aber auch solche heterobifunktionelle Verbindungsmoleküle kommen in Betracht, die mit Carboxylgruppen reagieren, beispielsweise mit Glutaminsäure- oder Asparaginsäureresten als Reaktanten. Beispielsweise seien Carbodiimide genannt.
Darüberhinaus sind aber auch die bekannten photoreaktiven Verbindungsmoleküle geeignet, welche eine funktionelle photoaffine Gruppe aufweisen, die erst durch Exposition mit UV-Licht oder anderer sichbarer Strahlung (Photonen) reaktiv werden, beispielsweise aromatische Azide (Arylazide) oder Benzophenone, welche mit Aminen, Sulfhydrylen, Carbohydraten und Carbonylen reagieren.

Als Beispiele einiger heterobifunktioneller Verbindungsmoleküle, die für die Herstellung von mindestens bispezifischen Reagenzien, insbesondere Antikörpern,

in Betracht kommen, können folgende Verbindungen in Betracht kommen, wobei diese Aufzählung nicht vollständig ist und der Fachmann weitere ihm geeignete Verbindungen aus dem Stand der Technik entnehmen kann:
4-succinimidyloxycarbonyl-α-methyl-α(2-pyridyldithio)-toluol [SMPT],
N-succinimiyl 3-(2-pyridyldithio)propionat [SPDP],
Sulfosuccinimidyl 6-[3-(2-pyridyldithio)propionamido]hexanoat,
Sulfosuccinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat,
Succinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat [SMCC],
N-Succinimidyl (4-iodoecetyl)aminobenzoat [SIAB],
5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoesäure) [Ellman's Reagenz].

Als Beispiele einiger homobifunktioneller Verbindungsmoleküle, die für die Herstellung von mindestens bispezifischen Reagenzien, insbesondere Antikörpern, in Betracht kommen, seien die folgenden Verbindungen genannt, wobei auch diese Aufzählung nicht vollständig ist und der Fachmann weitere ihm geeignete Verbindungen dieser Art aus dem Stand der Technik ohne weiteres verwenden kann:
Dithio*bis*(succinimidylpropionat) [DSP],
3,3'-Dithio*bis*(sulfosuccinimidylpropionat) [DTSSP],
Bis(sulfosuccinimidyl)suberat,
Disuccinimidylsuberat [DSS],
Disuccinimidyltartrat [DST].

Als Beispiele einiger photoreaktiver Verbindungsmoleküle, die für die Herstellung von mindestens bispezifischen Reagenzien, insbesondere Antikörpern, in Betracht kommen, seien die folgenden Verbindungen genannt, wobei diese Aufzählung ebenfalls nicht vollständig ist und der Fachmann weitere ihm geeignete Verbindungen dieser Art ohne weiteres aus dem Stand der Technik entnehmen kann:
Azidobenzoyl Hydrazid,
N-Hydroxysuccinimidyl-4-azidosalicylsäure,
N-[4-(*p*-azidosalicylamido)butyl]-3'(2'-pyridyldithio)propionamid [ADPD].

Die Verwendung solcher und der weiteren bekannten Verbindungsmoleküle zur Herstellung bispezifischer Antikörper gestatten somit auch vielfache Markierungsmöglichkeiten der erhaltenen Produkte, wie beispielsweise Radiomarkierungen mit radioaktiven Isotopen zum Beispiel über entsprechende

Iodierung von beispielsweise 1-(*p*-Azidosalycylamido)-4-(iodoacetamido)butan oder beispielsweise Fluoreszenzmarkierungen durch Verwendung geeigneter Verbindungsmoleküle, zum Beispiel von Sulfosuccinimidyl7-azido-4-methylcoumarin-3-acetat.

Die genannten und die anderen dem Fachmann bekannten Verbindungsmoleküle lassen sich nach an sich bekannten Methoden herstellen oder sie sind kommerziell erhältlich (z.B. Pierce Europe B.V., Oud-Beijerland, Holland). Die genannten und weitere für die vorliegende Erfindung geeignete und zu verwendende homo- und heterobifunktionelle Verbindungsmoleküle und deren Anwendungen und Reaktionen mit den reaktiven Gruppen der betreffenden Proteine bzw. Immunglobuline sind ferner individuell beschrieben von BRINKLEY, M., Bioconjugate Chem., 3, 2 - 13, 1992 und von MATTSON, G. et al., Mol. Biol. Rep. 17, 167 - 183, 1993. Weitere zum Zweck der Herstellung von bispezifischen Antikörpern geeignete Verbindungsmoleküle sind individuell beschrieben von SCHEIDTMANN; K. H. In: Protein structure, a practical approach, Creighton, T. E. (Ed.), IRL Press at Oxford University Press, Chapter 4, 93 - 115, 1989; TRAUT, R. R. et al. In: Protein function, a practical approach, Creighton, T. E. (Ed.), IRL Press at Oxford University Press, Chapter 5, 101 - 133, 1989; TAE, H., Methods in Enzymology 91, 580 - 609, 1983; BÄUMERT, H. G. & FASOLD, H., Methods in Enzymology 172, 584 - 609, 1989.

Die Herstellung der über die oben beschriebenen Verbindungsmoleküle kovalent verbundenen Antikörper kann nach literaturbekannten Methoden erfolgen, wie sie zum Beispiel in den schon genannten Veröffentlichungen über die Verbindungsmoleküle beschrieben sind, einschließlich der dort angegebenen weiteren Literatur (beispielsweise BRINKLEY, M., 1992, loc. cit.; MATTSON, G. et al., 1993, loc. cit.; Katalog von Pierce).

Beispielsweise kann die Herstellung eines mindestens bispezifischen Reagenz, wenn Y gemäß Tabelle 1 ein Protein, insbesondere ein Imunoglobulin bzw. ein Antikörper ist, durch kovalente Bindung dadurch erfolgen, daß geeignete Immunglobuline nach an sich bekannter Methode gewonnen und gereinigt werden. Anschließend werden diese Immunglobuline, beispielsweise ein IgG, mit einem geeigneten Verbindungsmolekül, beispielsweise ein homobifunktionelles Verbindungsmolekül, beispielsweise ein Imidoester, unter geeigneten Bedingungen in Reaktion gebracht. Die Reaktionsprodukte können dann nach bekannten

Verfahren von den übrigen Bestandteilen der Reaktionslösung getrennt und gereinigt werden, beispielsweise durch Dialyse, Zentrifugation und/oder Chromatographie.

Neben den genannten hetero- und homobifunktionellen und photoreaktiven Verbindungsmolekülen kommt auch die Verbindung zweier Reagenzien, beispielsweise Antikörper, zur Herstellung von Y der Komponente 2, mit Avidin bzw. Streptavidin und Biotin in Betracht. Hierbei wird die hohe Avinität zu Biotin genutzt. Um ein bispezifisches, für die Komponente 2 vorteilhaft zu verwendendes Reagenz Y zu erhalten (zum Beispiel ein bispezifischer Antikörper), wird einer der zu koppelnden Antikörper mit Biotin und der andere Antikörper mit Streptavidin nach bekannten Methoden markiert. Nach äquimolarer Mischung beider markierter Antikörper ergibt sich über die Avidin (Streptavidin)-Biotin-Kopplung ein bispezifisches Reagenz hoher Stabilität. Ein Vorteil bei dieser Methode liegt darin, daß durch die leichte Austauschbarkeit der jeweiligen Partner (anti-Ha_1 und anti-Ha_2 bzw. anti-Ha_n) ein großes Spektrum verschiedener bispezifischer Reagenzien Y herstellbar wird. So kann zum Beispiel ein Streptavidin-markierter Antikörper mit Spezifität für eine bestimmte Determinante Ha_1 mit einer Vielzahl von Biotin-markierten Antikörpern, die unterschiedliche Determinanten (Ha_n) erkennen, gekoppelt werden.

Bispezifische Antikörper, die über Hybridhybridoma-Fusion hergestellt werden, zeigen gegenüber solchen Heterokonjugaten, die über chemisches Cross-linking erzeugt werden, gewisse Vorteile. Chemisch über beispielsweise heterobifunktionelle Linker erzeugte Antikörper sind dimere oder multiaggregierte Moleküle, die sehr viel schneller über das reticuloendotheliale System entfernt werden und somit eine viel kürzere Halbwertszeit im Blutkreislauf aufweisen als solche, die über Hybridhybridoma hergestellt werden. Derartige große, über chemische Linker erzeugte Heterokonjugate können ferner den Nachteil haben, daß sie schwerer in das extravaskulare Gewebe eindringen. Aufgrund ihrer Bi- oder Multivalenz können sie leichter auf dem Zielantigen Modulationen induzieren. Da bekannt ist, daß das Membran-Immunoglobulin von Lymphomazellen leicht moduliert wird, wenn es durch bivalente Antikörper kreuzverbunden wird, werden, beispielsweise im Falle von Lymphomen, über Hybridhybridoma Fusionen hergestellte bispezifische Antikörper als bevorzugte Komponente 2 (Y) betrachtet.

Für den Fall einer *in vitro* Verwendung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen, können jedoch auch chemisch, beispielsweise über hetero- oder homobifunktionelle Linker hergestellte oder über Avidin(Streptavidin)-Biotin verbundene bispezifische Antikörper verwendet werden.

Ein gemäß der vorliegenden Erfindung zu verwendender bispezifischer Antikörper gemäß der Definition in Tabelle1 (Komponente 2) kann beispielsweise dergestalt sein, daß ein Antikörper bispezifisch ist für 2,4-Dinitrophenol (DNP) und für Digoxigenin (DIG). Die Herstellung eines solchen anti-DNP:anti-DIG Antikörpers kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß nach bekannten Methoden Mäuse mit geeigneten DNP- und DIG-Konjugaten immunisiert werden, die Milzzellen der immunisierten Mäuse mit Myelomzellen fusioniert werden, beispielsweise mit einem polyfunktionellen Alkohol (PEG) oder über Elektrofusion (beispielsweise gemäß VIENKEN, J., ZIMMERMANN, U. FEBS Letters 182:278 - 280, 1985), und die entstandenen Hybridome nach beschriebenen Verfahren selektiert und zu Tetradomen, beispielsweise über PEG-Fusion, fusioniert werden.

Die für die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen benötigten und nach den bekannten Verfahren herstellbaren Antikörper, können nach bekannten Methoden gereinigt werden, beispielsweise über Fällung, Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie, Immunoabsorptionschromatographie, Immunoaffinitäts-chromatographie, HPLC (High Performance Liquid Chromatography) oder Kombinationen davon. Antikörperfragmente, welche den Idiotyp des Moleküls enthalten, können gleichermaßen nach bekannten Verfahren hergestellt werden. Beispielsweise können $F(ab')_2$ Fragmente durch Pepsin Verdauung des vollständigen poly- oder monoklonalen Antikörpers erhalten werden. Fab Fragmente können erhalten werden, indem beispielsweise die Disulfidbrücken des betreffenden $F(ab')_2$ Fragments reduziert werden und Fab Fragmente können gewonnen werden beispielsweise durch Behandlung der Antikörpermoleküle mit Papain und gegebenenfalls einem Reduktionsmittel. Derartige Verfahren sind dem Fachmann bekannt und gehören zum Stand der Technik.

Eine Reinigung kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß die über die oben beschriebenen Verfahren erhaltenen Antikörper in einem Puffer (zum Beispiel Tris-HCl, 20mM, pH 8,0) auf das 3-fache Volumen verdünnt werden, danach gefiltert

(Filterporen ca. 0,2 µm) und über eine Q-Sepharose Fast Flow Säule gereinigt werden. Die Antikörperfraktion kann beispielsweise mittels eines NaCl Gradienten eluiert werden. Die gesammelten Fraktionen können anschließend in bespielsweise $NH_4(SO_4)_2$ (2 M) verdünnt und über eine geeignete Säule, zum Beispiel über eine Phenyl-Superose Säule, weiter gereinigt werden, wobei als Elutionsmittel ein linearer Gradient von beispielsweise 0,8 M $NH_4(SO_4)_2$ / 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 7,2) in Frage kommt. Die erhaltenen Fraktionen können anschließend anhand üblicher Assays getestet werden.

Zur Identifizierung und Selektion von Antikörpern, Fragmenten oder Derivaten davon, die mit mindestens einem Epitop des entsprechenden Antigens reagieren, kann jedes bekannte Verfahren verwendet werden. Beispielsweise dadurch, daß diese nach entsprechender Markierung detektierbar sind, wenn sie an isoliertes oder gereinigtes Antigen gebunden haben oder über Immunpräzipitation des beispielsweise über Gelfiltration, Chromatographie oder Polyacrylamidgele gereinigten Antigens, oder dadurch, daß Antikörper gegen ein entsprechendes Antigen mit anderen Antikörpern um das Binden an dasselbe Antigen konkurrieren.

Die Wahl, Art, Quelle und das Herstellungsverfahren der Antikörper für die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen sind nicht kritisch für die Ausführung der vorliegenden Erfindung. Sie können aus jeder Klasse oder Subklasse und durch jedes bekannte Verfahren, je nach dem welches der Fachmann für sich favorisiert, ausgewählt und hergestellt werden. Im Falle, daß die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen für den therapeutischen Gebrauch und zum "Targeting" von zu behandelten Zellen oder Geweben verwendet werden sollen, sind die dafür benutzten Antikörper hinsichtlich ihrer Toxizität auszuwählen. Ein beispielsweise mit einem Effektormolekül konjugierter Antikörper Z (gemäß Tabelle 1) zusammen mit den beiden anderen Komponenten 1 und 2, welche X und Y gemäß Tabelle 1 enthalten, kann vorerst *in vitro* auf Cytotoxizität getestet werden, wenn eine Kombinationspräparation für vorzugsweise immunotherapeutische Zwecke an Säugetierorganismen, insbesondere an Menschen, eingesetzt werden soll. An bekannten Tiermodellen, beispielsweise an Mäusen oder Ratten, kann die entsprechende Kombinationspräparation weiter hinsichtlich ihrer Wirksamkeit *in vivo* untersucht werden. Grundsätzlich ist es für den Fachmann ohne weiteres möglich einen Antikörper mit der Funktion X gemäß Tabelle 1, vorzugsweise ein monoklonaler Antikörper, gegen alle vorkommenden

antigenen Determinanten und Antigene auszuwählen, herzustellen und, wie oben skizziert, zu testen und zu untersuchen. Beispielsweise sind solche Antigene Tumor-, Bakterien-, Virus-, Parasiten-, Pilz-, Mycoplasmen-, Histokompatibilitäts-, Zelloberflächen-, Zellrezeptor-Antigene oder Antigene auf Basis von Toxinen, Enzymen, Allergenen oder andere physiologisch relevante Stoffe einschließlich pflanzliche Antigene.

Hinsichtlich diagnostischer Methoden, Nachweisverfahren oder Assays können die erfindungsgemäßen Kombinationspräparate bei allen bekannten serologisch-immunologischen diagnostischen Verfahren verwendet werden.
Beispielsweise eignen sich die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen bei Immunfluoreszenztests, beispielsweise direkter (IFT) oder indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT); Enzymimmunoassays (EIA); Agglutinationstests, wie beispielsweise Agglutinationshemmtest, Immunsorbent Agglutination Assay (ISAGA); Radioimmunassays (RIA); Immunoradiometrischer Assay (IRMA), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), μ-capture-Assay; Enzym Membran Immuno Assay (EMIA); Immuno Enzymo-Metric-Assay (IEMA); Double Antibody Liquid Phase-Assay (DALP-Technik); Fluoreszenzimmunoassay (FIA), beispielsweise homogener Fluoreszenzimunoassay, Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay, Fluoreszenz-Enhancement-Immunoassay, Fluoreszenz Quenching Immunoassay, Fluoreszenz Excitation Transfer Immunoassay (FETIA), Substrate Labelled Fluorescent Immunoassay (SLIFA), Heterogener Fluoreszenz Immunoassay, Immunofluorometrischer Assay (IFMA), Time Resolved Fluorescence Immunoassay (TR-FIA); Lumineszenzimmunoassay, beispielsweise Chemilumineszenz Immuno Assay (CELIA), Solid Phase Antigen Luminescence Technique (SPALT), Immunoluminometrischer Assay (ILMA), Immunoluminometric Labelled Second-antibody Assay (ILSA); Immunoblot bzw. Western blotting oder Dot-blot Techniken.
Es soll an dieser Stelle hervorgehoben werden, daß die oben beispielhaft aufgezählten in der Literatur beschriebenen und dem Fachmann bekannten, für die Verwendung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen geeigneten Verfahren nicht vollständig sind und auch nicht sein müssen, da derartige Verfahren, die der immunologischen Diagnostik zur Verfügung stehen und die auf Basis von Immunglobulinen bzw. Antikörpern arbeiten, dem Fachmann bekannt sind. Überdies sind derartige Verfahren und Techniken in der Literatur vielfältig beschrieben, beispielsweise von BAUER, S., Lab. Med. 3, 50, 1979

(Immunfluoreszenztechniken); DWENGER, A., J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22, 883 - 894, 1984 (RIA); ADDISON, G. M. & HALES, C. N., In: Kirkham, K .E., Hunts, W.M. eds., Radioimmunoassay methods, Livingstone, Edinburgh, 595, 1971 (IRMA); OELLERICH, M., J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22, 895 - 904, 1984 und MIYAI, K., Adv. Clin. Chem. 24, 61 - 110, 1985 und LINKE, R., Mitt. Dt. Ges. Klin. Chem., 1986, 291 (EIA); HEMMILÄ, I., Clin. Chem. 31, 359 - 370, 1985 und WISSER, H., GIT-Labormedizin 1985, 89 (FIA); WEEKS, I. et al. Clin. Science 70, 403 - 408, 1986 und GADOW, A. et al., J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22, 337 - 347, 1984 und WOOD, W.G. et al., J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22, 349 - 356, 1984 (Lumineszenzimmunoassay); BURNETTE, W.N., Anal. Biochem. 112, 195 - 203, 1981, (Western blotting), DESMONTS, G. et al., J. Clin. Microbiol. 14, 486 - 491, 1981 (ISAGA).

Wenn ein frühzeitiges Resultat an technischen Daten erwünscht ist, aufgrund dessen eine Diagnose erstellt werden kann, können solche Immunoassays bevorzugt sein, die innerhalb kurzer Zeit die gewünschten Daten zu liefern vermögen. Hierzu kommen beispielsweise solche Immunoassays in Betracht, die auf einem Sandwich-Test, kompetitiven Test, kolorimetrischen Test (wie beispielsweise der CEDIA™ Test gemäß HENDERSON, D. R., et al, Clin. Chem. 23(9):1637 - 1641, 1986) beruhen und als Schnelltests anwendbar und dem Fachmann bekannt sind.

Im Falle des Sandwich-Assays kann die Komponente 1 aus einem mit einer Determinante Ha_1 verbundenen Protein bestehen, das ein beispielsweise in einer Untersuchungsprobe enthaltenes Antigen erkennenden monoklonaler oder polyklonaler Antikörper sein kann, insbesondere ein monoklonaler Antikörper, welches an eine anti-Ha_1 Bindungstelle (von Komponente 2) binden kann und andererseits einen an ein Trägermaterial, beispielsweise eine Mikrotiterplatte, immobilisierten Fangantikörper erkennen kann. Komponente 2 kann dann über ihre anti-Ha_1 Stelle an Komponente 1 binden. Im weiteren kann ein mit einer Determinante Ha_2 ausgestattetes Mittel, beispielsweise ein Enzym, (zum Beispiel Meerrettischperoxidase), welches vorzugsweise reagieren kann mit einem detektierbaren Mittel, das heißt einem Markierungs- bzw. Indikatormolekül, beispielsweise 2,2'-azino-*bis*(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat (ABTS). Ein beispielsweise in der EP-B1 0 394 819 offenbartes Verfahren kann ohne weiteres für die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen adaptiert werden.

Eine andere Variante kann beispielsweise auf mit Biotin konjugierten Antikörpern beruhen, welche an einem mit Streptavidin beschichteten Träger binden. Durch Hinzufügen zu diesem System von Peroxidase markierten, mit einer Determinanten Ha_2 verbundenen Antikörpern und der zu untersuchenden Probe kann in Gegenwart eines geeigneten, detektierbaren Mittels (beispielsweise 2,2'-azino-*bis*(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat) die Farbreaktion nach bekannten Methoden spektrophotometrisch gemessen werden.

Vorteilhafterweise können demzufolge die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen auch für ein Verfahren auf Basis eines Immunoassays verwendet werden, bei dem beispielsweise ein erster mit einer Determinante Ha_1 ausgestatteter Antikörper, der an ein zu testendes Antigen in einer Probe binden kann, mit einem Bindungsprotein einer biologischen Bindekonstanten $k_{dis} \geq 10^{-12}$ M/L, beispielsweise Biotin oder ein Biotinderivat, verbunden ist. Ein entsprechendes, mit einer Determinante Ha_2 ausgestattetes Mittel, beispielsweise ein zweiter Antikörper, welcher entsprechend an ein Antigen in einer Probe bind n kann, kann vorteilhafterweise markiert sein mit einem Indikatormolekül. An einem Trägermaterial kann ein Protein mit Bindungsprotein-bindenden Eigenschaften gebunden sein. Im Falle, daß das Bindungsprotein Biotin ist, kommt hierbei Avidin oder Streptavidin oder ein funktionelles Derivat davon in Betracht. Als Indikatormolekül, mit dem der nicht mit einem Bindungsprotein verbundene, aber mit Ha_2 ausgestattete zweite Antikörper markiert ist, kommen alle bekannten Markierungs- oder Indikatormoleküle in Betracht, beispielsweise Meerrettichperoxidase. Der dadurch gebildete Immunkomplex kann nach bekannten Verfahren optisch dargestellt werden. Im Prinzip wird ein solcher auf Streptavidin-Biotin-Bindung beruhender Immunoassay beispielsweise beschrieben von MÜLLER-BARDORFF, M. et al., Circulation 92(10):2869 - 2875, 1995, welches ohne weiteres in vorteilhafter Weise für die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen übertragen und damit angewendet werden kann.

In einer weiteren Variante eines ELISA Sandwich-Assays zur Detektierung von Antigenen in einer Probe kann ein Trägermaterial, beispielsweise übliche Mikrotiterplatten, mit Antikörpern gegen dieses Antigen beschichtet ("gecoated") werden, wonach die Probe mit diesem beschichteten Trägermaterial in Gegenwart eines geeigneten Puffers in Kontakt gebracht wird. Unter vorheriger Zugabe der entsprechenden Komponente 2 kann anschließend ein geeignetes mit einer

Determinanten Ha_1 ausgestattetes Reagenz, beispielsweise ein Antikörper hinzugegegeben und entsprechend in Gegenwart eines geeigneten Puffersystems inkubiert werden. Danach kann ein mit einer Determinanten Ha_2 ausgestattetes IgG-Peroxidase-Konjugat und ein geeignetes Reagenz (beispielsweise *o*-Phenylendiamin) hinzugefügt und die Reaktion mittels einer Mineralsäure (z.B. H_2SO_4) gestoppt werden. Anschließend kann die Absorption nach üblichen Methoden gemessen werden. Das beispielsweise von TSUBOUCHI, H. et al., Hepatology 13(1):1 - 5, 1991, beschriebene Verfahren kann ohne weiteres auf die Anwendung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen übertragen werden.

Als Trägermaterial, welches für das erfindungsgemäße Verfahren in Frage kommt, und welches gemäß der vorliegenden Beschreibung mit entsprechenden Bindungsproteinen beschichtet sein kann bzw. an dem erfindungsgemäß die geeigneten Reagenzien, Proteine oder speziell Antikörper immobilisiert sein können, eignen sich alle bekannten, für einen Immunoassay verwendbaren Materialien. Insbesondere kommt jedes wasserunlösliche Material in Betracht, von dem der Fachmann weiß, daß es Proteine bzw. Polypeptide auf seiner Oberfläche binden bzw. adsorbieren kann, vorzugsweise solches aus Kunstoffen, wie beispielsweise Polyvinyle, Polystyrole, Acrylate, Polypropylene, Polycarbonate, Silikone. Derartige aus solchen Stoffen bestehenden Trägermaterialien können von unterschiedlicher Form und Größe sein, je nach den individuellen Bedürfnissen des Fachmanns, der den Assay anwendet. Demgemäß kann das Trägermaterial aus mit einem Hohlkörper (beispielsweise Röhrchen, Tuben, Küvetten) oder aus mit mindestens einer Vertiefung oder Mulde, die gerundet oder eckig ausgestaltet sein kann, versehenen Formkörper bestehen, der vorzugsweise flächig ausgestaltet sein kann (beispielsweise Platten, Scheiben, Tafeln, Streifen, Objektträger, Mikrotiterplatten).

Um die in einem Immunoassay erfindungsgemäß zu verwendeten Mittel der Komponente 3 detektierbar zu machen, können diese in geeigneter Weise und nach bekannten Methoden mit Markierungs- oder Indikatormolekülen markiert werden. Besonders geeignete Markierungs- oder Indikatormoleküle für das erfindungsgemäße Verfahren sind mit Determinanten Ha_2 bzw. Ha_n ausgestattete Proteine, beispielsweise Antikörper, Enzyme (beispielsweise Peroxidasen, β-Galaktosidasen, alkalische Phosphatase), und daran gekoppelte Farbstoffe (insbesondere Fluoreszenzfarbstoffe, beispielsweise Fluoresceinisothiocyanat),

paramagnetische Atome, chromogene Substrate (beispielsweise o-Phenylendiamin oder 2,2'-Azino-di[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat(6)], Radioisotope (beispielsweise der Halogene, des Technetiums, des Bleis, des Thalliums, des Indiums oder des Quecksilbers) Metalle (beispielsweise Gold bzw. Goldpartikel oder Silber). Verfahren zur Durchführung solcher Markierungen sind dem Fachmann bekannt und sind literaturbeschrieben. Im Falle, daß als Indikatormolekül Gold bzw. Goldpartikel verwendet werden, kann gemäß der bekannten Immungold-Technik das Gold mit einem Protein mit Bindungsprotein-bindenden Eigenschaften, beispielsweise mit Biotin bindenden Proteinen (beispielsweise Avidin oder Streptavidin) überzogen werden. Im Zusammenspiel mit beispielsweise entsprechend biotinylierten Antikörpern erfolgt die optische Detektierung. Ein derartiges der optischen Detektierung zugrundeliegendes Signal kann zusätzlich verstärkt werden, indem die Fähigkeit der Goldpartikel ausgenutzt wird, in Gegenwart eines geeigneten Reduktionsmittels (beispielsweise Hydrochinon), Silberionen zu reduzieren. In diesem Fall wird bei dieser Immungold-Silberfärbung eine Nachkontrastierung dadurch erzielt, daß sich Silber auf den Goldpartikeln niederschlägt, sodaß eine dunkelbraune bis tiefschwarze Färbung erzeugt wird. Dadurch kann vorteilhafterweise eine Empfindlichkeitssteigerung des betreffenden Immunoassays zum Nachweis von Antigenen in einer Untersuchungsprobe erzielt werden.

Die Detektierung über Biotin kann über Biotinylierung mittels bekannter Methoden erfolgen, beispielsweise dadurch, daß die Bindung eines Antigens an Biotin unter Verwendung von N-hydroxysuccinimidbiotin (beispielsweise in Dimethylsulfoxid) in bekannter Weise erfolgt. Derart biotinylierte Antigene bzw. die entsprechenden Antikörperkomplexe können identifiziert werden beispielsweise mittels Avidin-konjugierter alkalischer Phosphatase (ExtrAvidin, Sigma, Deisendorf, Deutschland).

In beispielhafter Weise kann eine Anwendung in einem Immunoassay dadurch erfolgen, daß Komponente 1 ein gegen ein bestimmtes Antigen, beispielsweise ein Tumorantigen, gerichteter mit einem Hapten Ha_1, beispielsweise 2,4-Dinitrophenyl (DNP), verbundener Antikörper (X in Ha_1—X), vorzugsweise ein haptenisierter monoklonaler Antikörper, ist. Als Komponente 3 kommt beispielsweise ein mit einem Hapten Ha_2 (zum Beispiel Digoxigenin (DIG)) verbundener Fluoreszenzfarbstoff (Z in Ha_2—Z) in Frage, zum Beispiel Fluoresceinisothiocyanat. Als Immunlinker (Komponente 2) kommt hierbei ein bispezifisches Reagenz in Betracht, welches anti-Ha_1 (anti-DNP):anti-Ha_2 (anti-DIG) Spezifitäten aufweist.

Vorzugsweise ist der Immunlinker ein bispezifischer monokolaler Antikörper mit den entsprechenden Spezifitäten. Die Komponenten 1 und 2 werden entweder zusammen mit Komponente 3 mit der zu untersuchenden Probe (Körperflüssigkeiten, Zellen, Gewebe oder Organteile) nach bekannten Verfahren in Kontakt gebracht oder Komponente 3 kann nach erfolgter Reaktion der Komponenten 1 und 2 anschließend, zeitlich verzögert, hinzugefügt werden. Eine nähere Beschreibung über bevorzugte Anwendungsmodalitäten erfolgt an anderer Stelle der vorliegenden Beschreibung.

Eine weitere Bedeutung in der Anwendung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen liegt darin, daß sie zum "Imaging" geeignet sind. Darunter ist das spezifische Detektieren, Auffinden und Lokalisieren von gesunden, nicht-pathologischen und pathologisch veränderten bestimmten Zellen und Geweben und Teilen davon *in vitro* und *in vivo*, also extrakorporal und intrakorporal, zu verstehen. Pathologisch veränderte Zellen und Gewebe können beispielsweise maligen entartete Zellen oder Gewebe sein. Ein solches "Imaging" kann dadurch erfolgen, daß X und Z gemäß Tabelle 1 definitionsgemäß mit zwei verschiedenen Determinanten Ha_1 und Ha_2 (bzw. Ha_n), beispielsweise Haptenen, konjugiert sind und Y entsprechende anti-Ha_1 und anti-Ha_2 (bzw. anti-Ha_n) Spezifitäten aufweist. In diesem Fall kann Z ein mit einer radioaktiven Substanz, mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder mit einem Kontrastmittel markiertes Trägermolekül sein, beispielsweise ein mit einer Determinanten ausgestattetes Protein, beispielsweise ein Enzym. Betreffend radioaktive Isotope kommen alle bekannten β- und γ-Emitter in Betracht, vorzugsweise jedoch solche mit kurzer Halbwertszeit. Im Falle, daß ein Radioisotop gewählt wird, stehen dem Fachmann die ihm bekannten radioaktiven Mittel zur Verfügung, beispielsweise sind geeignet ^{125}I, ^{123}I, ^{131}I, ^{111}In, ^{113m}In, ^{99m}Tc, ^{203}Pb, ^{201}Tl, ^{198}Hg, ^{90}Y, ^{186}Re, ^{60}Co, ^{67}Ga, ^{75}Se, ^{112m}Ag, ^{198}Au, ^{203}Hg, ^{32}P, ^{51}Cr, ^{59}Fe. Als Fluoreszenzfarbstoff kommt beispielsweise ein Fluorescein (zum Beispiel Fluoresceinisothiocyanat) und als Kontrastmittel beispielsweise ein paramagnetisches Kontrastmittel in Betracht. Mittels dem Fachmann bekannter, geeigneter Vorrichtungen, beispielsweise mit einer Gamma-Scintillationskamera, über magnetische Resonanzmessung oder mikroskopisch, können mit einer solchen Kombinationspräparation Zell- und Gewebetypen und Teile davon leicht detektiert und lokalisiert werden. In derartigen Systemen können natürlich die Determinanten, beispielsweise Haptene, selber das Objekt einer derartigen Markierung sein.

BNSDOCID <WO__9808875A1_I_>

Auch in diesem Fall kann Komponente 3, beispielsweise konjugiert mit einem Isotop, zeitlich verzögert gegeben werden, verbunden mit dem Vorteil einer geringeren radioaktiven Belastung beim *in vivo* Imaging.

Zur näheren Erläuterung der Verwendung einer der der Erfindung zugrundeliegenden Kombinationspräparationen für das Imaging soll im weiteren eine noch detailiertere Beschreibung erfolgen, obwohl der Fachmann zu diesem Zweck auf seine Erfahrung und die ihm bekannte Literatur zurückgreifen kann und ihm von daher eine Anzahl von Verfahren zur Verfügung steht, die er für den erfindungsgemäßen Zweck ohne weiteres unter seinen Laborbedingungen übernehmen, anpassen und verwenden kann.

Grundsätzlich ist bei einem Immunimaging zu berücksichtigen, in wie weit ein "Targeting" kleiner radiomarkierter Liganden durch bispezifische Reagenzien (zum Beispiel Antikörper) vermittelt werden kann, ob dieses "Targeting" genügend spezifisch ist und welche Art von radioaktiv markierten Antigen oder Hapten (Z oder Ha_2 bzw Ha_n in Ha_2-Z bzw Ha_n-Z gemäß Tabelle 1) vorzugsweise verwendet werden soll. Zur Lösung derartiger Fragen kann Z, beispielsweise ein Antikörper oder ein anderes Protein bzw. Fragment davon, direkt mit einem Radioisotop nach bekannten Verfahren markiert werden, oder die Markierung erfolgt über Kopplung des entsprechenden Isotops an eine ausgewählte Determinante Ha_2, beispielswiese ein Hapten, bzw. an ausgewählte Determinanten bzw. Haptene Ha_n, welches bzw. welche an ein Träger (Z) gebunden ist. Im Falle eines Haptens kann dieses aus einem monovalenten Hapten oder einem bivalenten Hapten bestehen, welches hydrophob oder hydrophil sein kann.

Als monovalentes, hydrophiles Hapten kommt beispielsweise Dinitrophenyl in Frage, welches mit einem der oben genannten Radioisotopen markiert und an ein Protein oder Peptid gebunden sein kann, beispielsweise ^{125}I oder ^{111}In. Beispiele für bivalente hydrophile Haptene sind Derivate der Diethylentriaminpentaessigsäure, worin Isotope, beispielsweise ^{125}I oder ^{111}In als Metallchelate vorliegen können. Derartige Haptene sind in der Lage, über ihre Carboxylgruppen im Sinne einer Säureamidbindung vorzugsweise an Peptide oder Proteine (Z) zu binden.

Wenn ein Imaging, insbesondere ein Immunoimaging von Tumoren, unter klinischen Bedingungen durchgeführt werden soll, kann Z vorzugsweise ein über ein bivalentes, hydrophiles Hapten chelatisiertes Radioisotop, beispielsweise ^{125}I oder ^{111}In, sein, welches beispielsweise durch Reaktion mit dem zyklischem Anhydrid der Diethylentriaminpentaessigsäure erhalten werden kann, beispielsweise gemäß LE DOUSSAL, J.-M. et al., Cancer Res. 50, 3445 - 3452, 1990. Für solch einen

Fall sind bivalente Haptene, insbesondere hydrophiler Natur, bevorzugt gegenüber monovalenten, hydrophoben Haptenen. Weitere Beispiele für in Frage kommende bivalente Haptene wären Dinitrophenylderivate bzw. Abkömmlinge der N-ε-Dinitrophenylaminocapronsäure, welche mit ^{125}I jodiert oder mit ^{111}In markiert werden können. Derartige Haptene sind kommerziell erhältlich. Für weitere Beispiele für die Verwendung und Herstellung mono- und bivalenter Haptene, welche mit beispielsweise ^{125}I oder ^{111}In markiert sein können und die über Säureamidbindungen an Aminosäuren und somit an Peptide und Proteine kovalent gebunden sein können, und die bekannterweise für ein Tumorimaging aber auch für therapeutische Zwecke im Sinne der vorliegenden Erfindung geeignet sind, ist auf die Literatur zu verweisen, beispielsweise auf LE DOUSSAL, J.-M. et al., J. Nucl. Med. 30, 1358 - 1366, 1989. Allgemein kann auf der Grundlage der Ergebnisse von LE DOUSSAL, 1990, *loc cit.*, davon ausgegangen werden, daß bivalente Haptene gegenüber monovalenten Haptenen Vorteile besitzen.

Dem Fachmann sind die Methoden der Markierung von Proteinen einschließlich Antikörpern mit Radioisotopen aus der vielfältigen Literatur gut bekannt, sodaß es hierzu unnötig ist, auf spezielle Literatur hinzuweisen. Als Beispiel für eine radioaktive Markierung von Proteinen sollen rein exemplarisch die EP-A 0 237 150 oder die EP-A 0 36 678 genannt werden.

Auf diese Weise können mit den erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen Radioisotope direkt an den gewünschten Ort zielgerichtet transportiert werden. Betreffend die vorgenannte Verwendung eines Chelators ist für den Fachmann klar, daß nicht nur die beispielhaft genannten Chelatoren in Betracht kommen und nicht nur die damit chelatisierten, beispielhaft genannten Radioisotope, sondern daß alle bekannten Chelatoren für eine Vielzahl an detektierbaren Markern stehen können, insbesondere Radiometalle oder magnetresonanzverstärkende Metallionen. Weitere Beispiele geeigneter Chelatoren sind Ethylendiamintetraessigsäure oder Bisthiosemicarbazone von 1,2- oder 1,3-Dicarbonylverbindungen.

Hinsichtlich einer geeigneten Applikationsweise der drei Komponenten Ha_1—X, anti-Ha_1—Y—anti-Ha_2 bzw. —Y—anti-Ha_n und Ha_2—Z bzw. Ha_n—Z für ein Tumorimaging, können diese gleichzeitig, sequentiell oder konsekutiv gegeben werden. Vorteilhaft kann aber eine schrittweise Vorgehensweise sein, indem zuerst die Komponente 1 (X) gegeben wird, um am Zielort zu binden, zusammen oder zeitlich getrennt mit der Immunolinkerkomponente (Y), und erst danach, um Minuten, Stunden oder Tage verzögert (abhängig vom Untersuchungszweck und

der Lokalisation, Größe und Art des Zielortes bzw. Tumors), die Komponente 3 (Z). Alternativ kann dieses schrittweise Verfahren auch dadurch erfolgen, daß das Zeitintervall der Applikation zwischen den Komponenten 1 und 2 (X bzw. Y) liegt und die Komponente 2 (Y) zusammen mit der Komponente 3 (Z) gegeben wird.

Hierdurch kann ein durch Komponente 1 (bzw. Komponenten 1 und 2) vermitteltes "pre-targeting" erreicht werden, wodurch eine effektivere Aufnahme von in diesem Fall radioaktivem(n) Determinanten, beispielsweise Hapten(en), bzw. von radioaktiv markiertem Z erfolgen kann. Außerdem ist damit eine schnellere Clearance der Determinante bzw. des Haptens bzw. der Komponente 3 aus dem Plasma zu erwarten, was zu einem verbesserten Tumor/Nicht-Tumor Kontrast führen kann. Ebenso möglich ist eine gleichsam zeitlich verzögerte Applikation aller drei Komponenten1, 2 und 3.

Als vorteilhaft kann eine Applikationsweise angewendet werden, bei der die Komponente 3, zeitlich um Minuten, Stunden oder Tage verzögert, zuletzt gegeben wird. Die Zeitintervalle der verzögerten Applikationen zwischen den Komponenten 1 und 2 und von Komponente 3 hängt insbesondere ab von dem gewählten Radioisotop bzw. dessen Halbwertszeit (welche zwischen 1,2 Minuten bei ^{112m}Ag und 121 Tagen bei ^{75}Se liegen kann) und der Art des zu untersuchenden Materials. Als Applikationsrouten kommen alle die dem Fachmann bekannten Wege in Betracht, insbesondere i.v., i.m., s.c., i.p., i.a., i.c.

Eine typische Verwendung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen für das Imaging besteht beispielsweise darin, daß ein nach bekannten Methoden hergestelltes monospezifisches, mit einem Hapten Ha_1 verbundenes monospezifisches Reagenz gemäß Komponente 1, worin X vorzugsweise ein Antikörper ist, in einen Säugetierorganismus beispielsweise i.v. appliziert wird, sodaß es spezifisch an eine korrespondierende Bindungsstelle (zum Beispiel ein Antigen bzw. Epitop bzw. eine "target structure") beispielsweise einer Tumorzelle bindet. Anschließend oder gleichzeitig wird die Komponente 2 gegeben (zum Beispiel i.v.), welche an die Determinante (Ha_1) über ihre anti-Ha_1 Spezifität bindet. Vorzugsweise zeitlich verzögert wird anschließend die mit einem geeigneten Radioisotop markierte und mit einer geeigneten Determinante Ha_2 oder geeigneten Determinanten Ha_n verbundene Komponente 3 verabreicht (in diesem Falle ebenfalls i.v.), die mit der anti-Ha_2 Stelle von Komponente 2 (Y—anti-Ha_2) reagiert. Zum Zweck einer Vorbestimmung betreffend die Bioverteilung des radioaktiven Mittels (Komponente 3) der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen können entsprechend behandelte Versuchstiere (Mäuse, Ratten, Kaninchen usw.) nach der

letzten Applikation getötet und ihre Organe sowie ihr Blut entnommen werden. Zur weiteren Untersuchung kann das Blut wie üblich heparinisiert, zentrifugiert und die Radioaktivität im Plasma gemessen werden. Die entnommenen Organe und Tumore werden üblicherweise in entsprechend große Schnitte zerlegt und deren Radioaktivität analog gemessen bzw. der Zerfall des betreffenden Radionuklids mit einem Counter gezählt. Auf diese Weise läßt sich das Verhalten von Komponente 3 in einem Säugetierorganismus vorbestimmen und die Applikationsweisen (Menge, Dosis, zeitliche Verabfolgung) ohne weiteres optimieren.

Für das eigentliche Imaging kann das zu untersuchende Säugetier oder der Patient zuerst mit der Komponente 1 (im Falle eines Antikörpers vorzugsweise ein humanisierter Antikörper, wenn ein Mensch untersucht werden soll) injiziert werden (systemisch oder topisch, beispielsweise i.v., i.m. oder s.c., in die Nähe, an oder in das zu untersuchende Material). Anschließend oder gleichzeitig mit Komponente 1 wird die Komponente 2 und, vorzugsweise zeitlich verzögert, die mit einer geeigneten Determinante Ha_2 verbundene, radioaktiv markierte Komponente 3 über die entsprechende gleiche Route appliziert. Beispiele für dafür geeignete Radioisotope sind ^{125}I und ^{111}In, beispielsweise im Bereich von 1 bis 500 µCi ($3{,}7 \cdot 10^4$ bis $1{,}85 \cdot 10^7$ Bq), insbesondere um 100 µCi ($3{,}7 \cdot 10^6$ Bq).

Einem solchen Zweischrittsystem folgend, wird in einer ganz bevorzugten Ausführung ein monoklonaler Antikörper mit anti-Tumor Eigenschaften und mit einem Hapten Ha_1, welches beispielsweise ein Dinitrophenylderivat, zum Beispiel 2,4-Dinitrophenol (DNP), sein kann (Komponente 1), gekoppelt, mit einem bispezifischen monoklonalen Antikörper mit anti-Ha_1:anti-Ha_2 Eigenschaften (beispielsweise anti-DNP:anti-DIG, wenn Ha_2 ein Digoxigenin [DIG] ist) in üblicher Weise intravenös in einen Säugetierorganismus gegeben. Nach einem geeigneten Zeitintervall von beispielsweise 24 bis 120 Stunden als Richtwert (abhängig von der Affinität des gewählten Antikörpers der Komponente 1, des gewählten Isotops und der Art des Tumors) wird die Komponente 3, beispielsweise ein ^{111}In-markiertes oder ^{123}I-markiertes mit DIG haptenisiertes Trägermolekül, beispielsweise ein Protein, intravenös appliziert, gegebenenfalls zusammen mit einer geringeren Menge von Komponente 2 als Träger. Auf diese Weise kann das ^{111}In oder das ^{123}I an den vorher mit Komponente 1 bzw. Komponente 2 "vormarkierten" Tumor spezifisch und zielgerichtet transportiert werden und die gewünschte Wirkung entfalten. Ein ähnliches, jedoch herkömmliches System wird beispielsweise von STICKNEY, D. R. et al., Antibody, Immunoconjugates, and Radiopharmaceuticals 2(1), 1 - 13, 1989, beschrieben. Nach der letzten Injektion

werden in entsprechenden zeitlichen Intervallen von beispielsweise 0.5, 1, 2, 4, 6, 10, 24, 48 oder 72 Stunden über eine Gammakamera szintigraphische Aufnahmen vorgenommen und die erhaltenen Szintigramme wie üblich ausgewertet.
Diese beispielhafte Darstellung stellt selbstverständlich nur eine Möglichkeit dar, die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen zu verwenden und der Fachmann ist ohne weiteres in den Lage, andere Variationen anzuwenden und äquivalente Anwendungen durchzuführen. Auf die vielfältige Literatur sei daher hingewiesen, auf die hier nicht erschöpfend eingegangen werden kann und aus vorgenannten Gründen auch nicht eingegangen werden muß.

Es ist daher auch selbstverständlich, daß ein solches "pre-targeting" auch bei den anderen beschriebenen immundiagnostischen Verfahren *in vitro* angewendet werden kann, wofür die zu untersuchende Probe zuerst mit der Komponente 1, dann entweder gleichzeitig oder verzögert mit den Komponente 2 und nach einer minütlichen oder stündlichen Verzögerung mit Komponente 3 in Kontakt gebracht wird.

Eine weitere vorteilhafte Verwendungsmöglichkeit der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen besteht in einem Verfahren zur Bestimmung, ob ein Mittel mit biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften umfassend ein Effektormolekül, ein Rezeptorbindungsmolekül, ein Immunglobulin bzw. Antikörper, eine Markersubstanz, ein Enzym, eine radioaktive Substanz, eine radioaktiv markierte Substanz, ein Kontrastmittel, eine biologisch aktive Substanz, ein cytotoxisch, cytocidal, cytostatisch oder cytolytisch wirkendes Mittel oder ein beliebiges Antigen mit Effektor- Marker- oder Reporterfunktion, eine Wirkstoffvorstufe (prodrug), ein Adhäsionsmolekül, ein Cytokin, ein Lymphokin, ein Chemokin, ein Ligand, eine bei der *in vitro* und *in vivo* Diagnostik, bei der Immuntherapie oder bei Immunisierungen geeignete biologische, chemische oder physikalische Wirkung *in vitro* oder *in vivo* entfaltet oder zeigt, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man a) eine erste Kombinationspräparation bestehend aus Komponente 1, 2 und 3 gemäß Tabelle 1, mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definitionen für X, Y, Z, Ha_1 und Ha_2 bzw. Ha_n, mit einem ersten zu bestimmenden Mittel Z mit biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften herstellt, b) eine mindestens zweite Kombinationspräparation bestehend aus Komponente 1, 2 und 3 gemäß Tabelle 1, mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definitionen für X, Y, Z,

BNSDOCID: <WO__9808875A1_I_>

Ha_1 und Ha_2 bzw. Ha_n, mit einem von a) unterschiedlichen zweiten zu bestimmenden Mittel Z mit biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften herstellt, c) die nach a) und b) bereitgestellten Kombinationspräparationen nacheinander oder gleichzeitig in einem *in vitro* oder in einem *in vivo* System, welches gleich oder verschieden sein kann, in Kontakt bringt mit einer zu untersuchenden, spezifischen biologischen Bindungsstruktur bzw. einer zu untersuchenden Probe innerhalb oder außerhalb eines tierischen oder menschlichen Körpers, d) den Schritt gemäß c) beliebig wiederholt, wobei das zu bestimmende Mittel Z an Komponente 3 bei jeder Wiederholung hinsichtlich seiner biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften verschieden ist, e) die nach Schritt c) oder d) eingetretenen biologischen, chemischen oder physikalischen Wirkungen mißt, detektiert oder aufzeichnet und f) die nach e) erhaltenen Ergebnisse einzeln oder miteinander vergleichend auswertet.

Zusätzlich wird mit den erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen eine Variante des oben beschriebenen Verfahrens bereitgestellt, welche ebenfalls in vorteilhafter Weise geeignet ist zur Bestimmung, ob ein Mittel mit biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften umfassend ein Effektormolekül, ein Rezeptorbindungsmolekül, ein Immunglobulin bzw. Antikörper, eine Markersubstanz, ein Enzym, eine radioaktive Substanz, eine radioaktiv markierte Substanz, ein Kontrastmittel, eine biologisch aktive Substanz, ein cytotoxisch, cytocidal, cytostatisch oder cytolytisch wirkendes Mittel oder ein beliebiges Antigen mit Effektor- Marker- oder Reporterfunktion, eine Wirkstoffvorstufe (prodrug), ein Adhäsionsmolekül, ein Cytokin, ein Lymphokin, ein Chemokin, ein Ligand, eine bei der *in vitro* und *in vivo* Diagnostik, bei der Immuntherapie oder bei Immunisierungen geeignete biologische, chemische oder physikalische Wirkung *in vitro* oder *in vivo* entfaltet oder zeigt, dadurch gekennzeichnet, daß man a) eine Kombinationspräparation bestehend aus Komponente 1 und Komponente 2 gemäß Tabelle 1, mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definitionen für X, Y, Ha_1 und Ha_2 bzw. Ha_n, herstellt, b) die nach a) bereitgestellte Kombinationspräparation in einem *in vitro* oder in einem *in vivo* System in Kontakt bringt mit einer zu untersuchenden, spezifischen biologischen Bindungsstruktur bzw. einer zu untersuchenden Probe innerhalb oder außerhalb eines tierischen oder menschlichen Körpers, c) eine erste Komponente 3 gemäß Tabelle 1, mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definitionen für Z, mit einem ersten zu bestimmenden Mittel Z mit biologischen, chemischen oder physikalischen

Eigenschaften herstellt, d) die nach c) bereitgestellte Komponente 3 dem System nach b) hinzufügt, e) daran anschließend eine zweite oder weitere Komponente 3 gemäß Tabelle 1, mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definitionen für Z, mit einem zu bestimmenden Mittel Z mit von c) und untereinander unterschiedlichen biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften dem System gemäß b) gleichzeitig oder nacheinander hinzugibt, f) gegebenenfalls die Schritte a) bis e) beliebig wiederholt, wobei das zu bestimmende Mittel Z an Komponente 3 bei jeder Wiederholung hinsichtlich seiner biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften verschieden ist, g) die nach Schritt e) oder f) eingetretenen biologischen, chemischen oder physikalischen Wirkungen mißt, detektiert oder aufzeichnet und h) die nach g) erhaltenen Ergebnisse einzeln oder miteinander vergleichend auswertet.

Darüberhinaus wird mit den erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen in vorteilhafter Weise ein Verfahren bereitgestellt zum Screenen einer Pluralität von Mitteln mit biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften ausgewählt aus Effektormolekülen, ein Rezeptorbindungsmolekülen, Immunglobulinen bzw. Antikörpern, Markersubstanzen, Enzymen, radioaktiven Substanzen, radioaktiv markierten Substanzen, Kontrastmitteln, biologisch aktiven Substanzen, cytotoxisch, cytocidal, cytostatisch oder cytolytisch wirkenden Mitteln oder beliebige Antigenen mit Effektor- Marker- oder Reporterfunktion, Wirkstoffvorstufen (prodrugs), Adhäsionsmolekülen, Cytokinen, Lymphokinen, Chemokinen, Liganden, die eine bei der *in vitro* und *in vivo* Diagnostik, bei der Immuntherapie oder bei Immunisierungen geeignete biologische, chemische oder physikalische Wirkungen *in vitro* oder *in vivo* entfalten oder zeigen sollen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man a) eine erste Kombinationspräparation bestehend aus Komponente 1, 2 und 3 gemäß Tabelle 1, mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definitionen für X, Y, Z, Ha_1 und Ha_2 bzw. Ha_n, mit einem ersten zu bestimmenden Mittel Z mit biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften herstellt, b) eine mindestens zweite Kombinationspräparation gemäß Tabelle 1, mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definitionen für X, Y, Z, Ha_1 und Ha_2 bzw. Ha_n, mit einem von a) unterschiedlichen zweiten zu bestimmenden Mittel Z mit biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften herstellt, c) die nach a) und b) bereitgestellten Kombinationspräparationen nacheinander oder gleichzeitig in einem *in vitro* oder in einem *in vivo* System, welches gleich oder verschieden sein kann,

in Kontakt bringt mit einer zu untersuchenden, spezifischen biologischen Bindungsstruktur bzw. einer zu untersuchenden Probe innerhalb oder außerhalb eines tierischen oder menschlichen Körpers, d) den Schritt gemäß c) beliebig wiederholt, wobei das zu bestimmende Mittel Z an Komponente 3 bei jeder Wiederholung hinsichtlich seiner biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften verschieden ist, e) die nach Schritt c) oder d) eingetretenen biologischen, chemischen oder physikalischen Wirkungen mißt, detektiert oder aufzeichnet und f) die nach e) erhaltenen Ergebnisse einzeln oder miteinander vergleichend auswertet.

Eine Variante des vorgenannten Verfahrens zum Screenen einer Pluralität von Mitteln mit biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften ausgewählt aus Effektormolekülen, ein Rezeptorbindungsmolekülen, Immunglobulinen bzw. Antikörpern, Markersubstanzen, Enzymen, radioaktiven Substanzen, radioaktiv markierten Substanzen, Kontrastmitteln, biologisch aktiven Substanzen, cytotoxisch, cytocidal, cytostatisch oder cytolytisch wirkenden Mitteln oder beliebige Antigenen mit Effektor- Marker- oder Reporterfunktion, Wirkstoffvorstufen (prodrugs), Adhäsionsmolekülen, Cytokinen, Lymphokinen, Chemokinen, Liganden, die eine bei der *in vitro* und *in vivo* Diagnostik, bei der Immuntherapie oder bei Immunisierungen geeignete biologische, chemische oder physikalische Wirkungen *in vitro* oder *in vivo* entfalten oder zeigen sollen, ist dadurch gekennzeichnet, daß man a) eine Kombinationspräparation bestehend aus Komponente 1 und Komponente 2 gemäß Tabelle 1, mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definitionen für X, Y, Ha_1 und Ha_2 bzw. Ha_n, herstellt, b) die nach a) bereitgestellte Kombinationspräparation in einem *in vitro* oder in einem *in vivo* System in Kontakt bringt mit einer zu untersuchenden, spezifischen biologischen Bindungsstruktur bzw. einer zu untersuchenden Probe innerhalb oder außerhalb eines tierischen oder menschlichen Körpers, c) eine erste Komponente 3 gemäß Tabelle 1, mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definitionen für Z, mit einem ersten zu bestimmenden Mittel Z mit biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften herstellt, d) die nach c) bereitgestellte Komponente 3 dem System nach b) hinzufügt, e) daran anschließend eine zweite oder weitere Komponente 3 gemäß Tabelle 1, mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definitionen für Z, mit einem zu bestimmenden Mittel Z mit von c) und untereinander unterschiedlichen biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften dem System gemäß b)

gleichzeitig oder nacheinander hinzugibt, f) gegebenenfalls die Schritte a) bis e) beliebig wiederholt, wobei das zu bestimmende Mittel Z an Komponente 3 bei jeder Wi derholung hinsichtlich seiner biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften verschieden ist, g) die nach Schritt e) oder f) eingetretenen biologischen, chemischen oder physikalischen Wirkungen mißt, detektiert oder aufzeichnet und h) die nach g) erhaltenen Ergebnisse einzeln oder miteinander vergleichend auswertet.

Auch die für die genannten Verfahren in Frage kommenden Mittel mit biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften, wie sie in der vorliegenden Beschreibung beispielhaft genannt wurden, sind dem Fachmann bekannt oder er kann sie aus der vielfältigen Literatur entnehmen. Dementsprechend ist der Fachmann in der Lage, die geeigneten biologischen, chemischen oder physikalischen Wirkungen der potentiell in Frage kommenden Mittel zu erkennen. Solche Wirkungen oder Meßparameter können beispielsweise umfassen: Ausmaß an Cytolyse, Zelltod oder Cytotoxizität, Auftreten von spezifischen und unspezifischen Reaktionen des Immunsystems, Grad, Art und Ausprägung radioaktiver Markierungen bzw. radioaktiver Signale oder von Bindungen von radioaktiven Stoffen an Zielorten, Verlauf von Tumorwachstum, Grad von Stimulierungsreaktionen beispielsweise mittels Adhesionsmolekülen, Grad der Aktivierung und Akkumulierung von Effektorzellen, Art und Grad der Bindung von Effektormolekülen an einen Zielort, Verlauf von Autoimmunkrankheiten, Abstoßungsreaktionen, Infektionserkrankungen oder Erkrankungen des Gerinnungssystems, Außmaß und Effizienz eines "drug targeting" oder eines "cell targeting", Messung fibrinolytischer Potenz von fibrinolytisch aktiven Mitteln (zum Beispiel Urokinase, Streptokinase, Gewebeplasminogen Aktivatoren (tPA), Messung der Inhibition der Replikation oder Multiplikation von Viren, Eintritt von Immunisierungen, Messen von Farbstoffreaktionen, Radioaktivitäten, Immunreaktionen (zum Beispiel Trübungen, Agglutinationen) oder Bindungen an Zielorten (zum Beispiel Rezeptorbindungen) in Immunoassays.

Des weiteren wird mit den erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen in vorteilhafter Weise ein Verfahren zur Herstellung eines in der *in vitro* und *in vivo* Immundiagnostik verwendbaren Mittels ermöglicht, welches die Schritte umfaßt a) Bereitstellen mindestens einer Kombinationspräparation bestehend aus Komponente 1, 2 und 3 gemäß Tabelle 1, mit den in der vorliegenden Beschreibung

angegebenen Definitionen für X, Y, Z, Ha_1 und Ha_2 bzw. Ha_n, oder b) Bereitstellen mindestens einer Kombinationspräparation bestehend aus Komponente 1 und 2 gemäß Tabelle 1, mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definitionen für X, Y, Ha_1 und Ha_2 bzw. Ha_n, c) Identifizieren eines hinsichtlich seiner immundiagnostischen Eigenschaft biologisch, chemisch oder physikalisch wirksamen Mittels mittels der in a) und b) bereitgestellten Kombinationspräparationen über die oben offenbarten Bestimmungs- und Screenings-Verfahren d) Formulierung des aus c) erhaltenen Mittels in Form einer Kombinationspräparation gemäß Tabelle 1, mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definitionen für X, Y, Z, Ha_1 und Ha_2 bzw. Ha_n mit den bekannten Hilfs- und Trägerstoffen, oder d) Formulierung des aus c) erhaltenen Mittels durch Verbinden mit einem monospezifischen Reagenz, welches an biologische Bindungsstrukturen zu binden vermag, nach bekannten Methoden und mit den bekannten Hilfs- und Trägerstoffen, oder e) Formulieren des aus c) erhaltenen Mittels für sich allein nach bekannten Methoden mit den bekannten Hilfs- und Trägerstoffen.

Es ist für den Fachmann ohne weiteres ersichtlich, daß für die genannten Verfahren die Verwendung eines Mittels ganz besonders vorteilhaft ist, welches aus einer Kombinationspräparation besteht, umfassend die Komponenten 1, 2 und 3 gemäß Tabelle 1, mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definitionen für X, Y, Z, Ha_1 und Ha_2 bzw. Ha_n, oder bestehend aus einer Kombinationspräparation umfassend die Komponenten 1 und 2 gemäß Tabelle 1, mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definitionen für X, Y, Ha_1 und Ha_2 bzw. Ha_n, oder bestehend aus Komponente 2 gemäß Tabelle 1, mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definitionen für Y, in einem der genannten Bestimmungs-, Screening- oder Herstellungs-Verfahren.

Es soll an dieser Stelle hervorgehoben werden, daß selbstverständlich die in den oben offenbarten Verfahren und Verwendungen der Mittel für diese Verfahren beschriebenen technischen Merkmale die in der vorliegenden Beschreibung offenbarten Definitionen gelten.

Es soll an dieser Stelle auch betont werden, daß ein derartiges pre-targeting mit den erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen auch bei der Immuntherapie oder bei Immunisierungen *in vivo* zur Anwendung kommen kann, aber auch bei der

prophylaktischen und prognostischen Anwendung und zur Bestimmung von Krankheitszuständen und Krankheitsverläufen sowie zur Verhütung und Verhinderung des Ausbruchs oder der Entwicklung oder Exazerbation eines Krankheitszustandes.

Eine detailiertere Beschreibung über die Verwendung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen hinsichtlich Art und Dosierung bei klinischen Anwendungen soll weiter unten erfolgen. Da eine therapeutische/prophylaktische/prognostische und verhütende klinische Anwendung in enger Beziehung steht mit einem Imaging von Tumoren und anderen pathologisch/klinisch bedeutungsvollen Antigenen, gelten die hierzu vorgeschlagenen Maßnahmen in analoger Weise auch für die Zwecke des Imaging und *vice versa*.

Betreffend die Verwendung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen in der Therapie, insbesondere in der Immuntherapie, eröffnen sich eine Reihe an Anwendungsmöglichkeiten.

Wie auch bei der diagnostischen Anwendung, ist natürlich auch für die therapeutische Verwendung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen erfindungsrelevant, daß X und Z (Tabelle 1) mit zwei verschiedenen Determinanten Ha_1 und Ha_2 (bzw. Ha_n für Z) ausgestattet bzw. verbunden sind und daß Y entsprechende anti-Ha_1 und anti-Ha_2 (bzw. anti-Ha_n) Spezifitäten aufweist. Unter diesen festgelegten Voraussetzungen kann Z beispielsweise ein lytisch wirkender oder ein cytocidal bzw. cytotoxischer Wirkstoff (zum Beispiel ein Toxin, ein Enzym, ein anderes biologisch wirksames Protein oder ein Effektormolekül oder ein Radioisotop) sein, der insbesondere die Vermehrung und Proliferationsrate von malignen Tumorzellen hemmt, unterdrückt oder herabsetzt. In diesem Fall kann Z in der betreffenden Kombinationspräparation ein mit einer Determinante Ha_2 ausgestattetes, beispielsweise haptenisiertes, Enzym sein (beispielsweise alkalische Phosphatase), ein Cytokin (beispielsweise Interferon α, β oder γ oder Derivate davon, ein Interleukin, wie beispielsweise IL-2), mit einer Determinante, beispielsweise einem Hapten, ausgestattete Effektorzellen oder Triggermoleküle (beispielsweise cytotoxische T-Lymphocyten, Monocyten, Macrophagen, NK-Zellen, Granulocyten [polymorphonukleare Neutrophile, Eosinophile], Fc-Rezeptoren für IgG, CD2, CD3) ein cytotoxisches Toxin oder ein Radioisotop.

Hinsichtlich Toxinkonjugationen, die erfindungsgemäß in Betracht kommen, werden weitere und näher beschriebene derartige cytotoxische Substanzen für immuntherapeutische Zwecke, die zur Kopplung an die entsprechende Komponente der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen geeignet sind, beispielsweise in der EP-A 0 368 68, insbesondere auf den Seiten 6 bis 14, und in der dort aufgeführten Literatur, beschrieben.
Darüberhinaus ist ein "drug targeting" für die A-Kette von Ricin, für Vinca Alkaloide, Saporin, Daunomycin, alkalische Phosphatase (Umwandlung von Mitomycinphosphat zum wirksameren Mitomycinalkohol) übersichtlich in BRISSINCK, J., Drugs of the Future 17, 1003 - 1010, 1992, beschrieben.

Wenn ein oder mehrere Radioisotope für therapeutische Zwecke in Betracht kommen, so kommen hierfür die nach bekannten Methoden herstellbaren Radioimmunkonjugate in Frage. Hierbei ist Z gemäß Tabelle 1 als radioaktiv markiertes, mit mindestens einer Determinante, beispielswiese einem Hapten, ausgestattetes Molekül zu wählen oder wobei die Determinante selbst Träger von Radioisotopen sein kann, beispielsweise ein Hapten gemäß vorliegender Beschreibung und der bekannten Literatur. Es kommen insbesondere als Radioisotope sowohl β- als auch γ-Emitter in Frage, beispielsweise ^{125}I, ^{123}I, ^{131}I, ^{111}In, ^{99m}Tc, ^{90}Y, ^{186}Re. Derartige therapeutische Anwendungen sind auf dem "Fourth International Conference of Monoclonal Antibody Immunoconjugates for Cancer", San Diego, California, 30.3. - 1.4.1989, vorgestellt worden (GOLDENBERG, D. M., Immunology Today 10(9), 286 - 288, 1989).

Auch für die klinische Verwendung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparate kann es von Vorteil sein, die oben schon beschriebene Anwendungsweise in analoger Weise durchzuführen, unabhängig davon, ob Ha_2 in Z Träger der Radioaktivität ist oder ob das mit Ha_2 verbundene Z radioaktiv markiert ist oder ob Z ein anderes mit einer Determinante Ha_2 ausgestattetes, eine Wirkung entfaltendes Mittel bedeutet (beispielsweise ein Enzym, ein Cytokin, ein T-Lymphocyt, ein Adhäsionsmolekül usw.). Die für das Tumorimaging vorgeschlagenen Applikationsweisen für die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen finden daher für die klinische Verwendung entsprechende Anwendung. Es kann zudem von Vorteil sein, wenn multiple Injektionen von Komponente 3, gleichgültig ob damit ein Radioisotop oder ein anderer cytocidal, cytotoxischer oder cytostatischer Wirstoff oder eine

Markersubstanz verbunden ist, appliziert werden. Insbesondere dann, wenn es notwendig erscheint, über einen längeren Zeitraum zu behandeln. Damit können höhere Konzentrationen an Wirkstoff bzw. Radioaktivität am Wirkort erzielt werden. Im Falle, daß Tumorzellen innerhalb kurzer Zeit (< 1 Tag) auf eine Behandlung ansprechen und abgetötet werden können oder lediglich markiert bzw. detektiert werden sollen, wäre eine Bolusinjektion, die einmal oder mehrfach hintereinander gegeben werden kann, vorzugsweise in der vorbeschriebenen Weise über zwei Schritte, vorteilhaft. Eine derartige Einmalanwendung kommt sicher auch für den vorgenannten Zweck des Imaging in Betracht, da das zu lokalisierende Organ oder Gewebe nur für kurze Zeit ein Signal emittieren muß.

Allgemein gilt, daß für die Behandlung eines Tumors mittels der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen, gleichgültig welches antitumor wirkende Mittel damit verbunden ist, die Größe und Art (klein, groß, homogen, heterogen, Ausmaß der Vaskularisation, Stadium, Art des exprimierten Antigens) von Bedeutung sein kann. Für nicht oder schlecht lokalisierte, heterogene Tumore ist das Erreichen einer konstanten Plasmakonzentration an Wirkstoff wünschenswert. Für diesen Fall sind multiple, systemische Applikationen, vorzugsweise i.v. Injektionen, von Komponente 3 vorteilhaft. Andererseits wird bei lokalisierbaren Tumoren, beispielsweise der Lymphknoten oder des Peritoneums, eine lokale Applikation, gegebenenfalls mehrfach, erforderlich sein. Hinsichtlich des schon erwähnten Zweischritt-Verfahrens hängt der Zeitraum der Gabe von Komponente 3 (nach Applikation der Komponenten 1 und 2) davon ab, welche Bindungsaffinität die Komponente 1 (beispielsweise bestehend aus einem haptenisierten monoklonalen Antikörper mit spezifischer Reaktivität für ein bestimmtes Tumorantigen) für das betreffende Antigen besitzt. Bei einer hohen Bindungsaffinität kann das Zeitintervall ein Tag bis mehrere Tage sein. Die zu verwendende Dosis des zu applizierenden Wirkstoffs (Z), folgt vorteilhafterweise stöchiometrisch der Menge an vorab applizierten Komponenten 1 und 2. Daraus folgt, daß die Dosis von Komponente 1 letztendlich derjenige Faktor ist, der die Wirkung des eingesetzten Wirkstoffs (Z in Komponente 3) beeinflußt und bedingt - vorausgesetzt, alle drei Komponenten werden in einem stöchiometrischen Verhältnis zueinander eingesetzt, was hier natürlich grundsätzlich vorausgesetzt wird, und was auch einer der der Erfindung zugrundeliegenden Vorteile darstellt.

Hierzu kann allgemein gelten, daß hinsichtlich Komponente 1 eine hohe Tumorkonzentration bzw. eine hohe Konzentration am Zielorgan oder am Zielgewebe anzustreben ist, sodaß sich die Wahl einer geeigneten Komponente 1

als bindungsspezifisches Reagenz eindeutig nach dessen Bindungsaffinität am Zielort bzw. Zielantigen richtet.

Richtlinien für solche Anwendungen von Antikörper gebundenen Radioisotopen, Wirkstoffen oder "prodrugs" finden sich bei YUAN, F. et al., Cancer Res. 51, 3119 - 3130, 1991.

Umfaßt wird auch die Verwendung eines "prodrugs", das heißt einer Arzeimittel- bzw. Wirkstoff-Vorstufe, insofern, als daß ein derartiges prodrug mit einer Determinanten, beispielsweise einem Hapten, ausgestattet sein kann. Ein Beispiel für ein Konvertieren oder Aktivieren eines relativ nicht-toxischen prodrug am Zielort (beispielsweise ein Tumor) in einen cytotoxischen Wirkstoff ist die Umwandlung von Etoposidphosphat in Etoposid. Das kann dadurch erreicht werden, daß ein targeting oder pre-targeting mit den erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen mit der Maßgabe erfolgt, daß die Komponente 3 eine mit einer Determinanten Ha_2 ausgestattete alkalische Phosphatase ist und die Komponenten 1 und 2 die entsprechenden beschriebenen, bzw. korrespondierenden Eigenschaften aufweisen. Das Enzym bindet über Ha_2 an Y der Komponente 2 und diese wiederum über Ha_1 von Komponente 1 an den Zielort, in diesem Fall ein Tumor. Nach einer geeigneten Zeitverzögerung von annähernd 5 bis 24 Stunden, welche u.a. abhängig ist von der Tumorart und seiner Lokalisation (wie bereits oben ausführlich beschrieben), wird Etoposidphosphat in üblicher Applikationsweise (i.v., i.m., i.p., i.c., s.c.) in einer Dosis appliziert, in der diese Substanz nicht toxisch ist. Die Toxizität von Etoposidphosphat:Etoposid beträgt ca. 1:100. Am Zielort wird das relativ nicht toxische Etoposidphosphat in das cytotoxische Etoposid durch die alkalische Phosphatase (Komponente 3) enzymatisch umgewandelt und entfaltet die cytotoxische Wirkung erst am Tumor. Auf diese Weise können cytotoxische Wirkstoffe in einer nicht-toxischen Vorstufe als prodrug für therapeutische Zwecke durch Verwendung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen einem Säugetier unter weitgehender Vermeidung unerwünschter Nebenwirkungen zugeführt werden. Auch in diesem Fall ist das Zweischrittverfahren für die Anwendung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen ein vorteilhaftes und daher bevorzugtes Verfahren.

Erfolgreiche Aktivierungen von prodrugs über herkömmlich konjugierte Antikörper werden beispielsweise beschrieben von SENTER, P. D. et al.., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4842 - 4846, 1988, und von SENTER, P. D. et al., Cancer Res. 49, 5789 - 5792, 1989.

BNSDOCID: <WO___9808875A1_I_>

Wie schon eingangs beschrieben, können bispezifische Antikörper einen zielgerichteten Transport von Wirkstoffen oder Wirkmolekülen bzw. Effektorzellen vermitteln. Die Verwendung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen umfaßt selbstverständlich, und in analoger Weise wie für das Imaging schon ausführlich offenbart, gleichfalls das targeting derartiger Mittel. Lediglich zur Illustration dieses Sachverhalts kann beispielsweise Z gemäß Tabelle 1 ein mit Ha_2 haptenisiertes CD3 sein und X ein mit Ha_1 haptenisierter anti-Tumor Antikörper, wobei Y die bispezifische Eigenschaft anti-Ha_1:anti-Ha_2 aufweist. Gleichermaßen kann Z in Ha_2—Z ein anderes Triggermolekül (beispielsweise CD4, CD8, CD15, CD16, CD19, CD25, CD28, CD30, CD32, CD58, CD59, CD64) und Kombinationen davon (beispielsweise CD3/CD30, CD3/CD19), ein beliebiges Enzym (zum Beispiel Urokinase, tPA, alkalische Phosphatase), eine beliebige Effektorzelle (CTL, NK-Zelle), ein beliebiges Cytokin (Interleukine, Interferone), ein gegen pathogene Erreger gerichteter Antikörper (zum Beispiel anti-Nukleoprotein, anti-Hämagglutinin von Influenzaviren, anti-HIV Antigene) sein. Für X in Ha_1—X steht jedes diagnostisch und therapeutisch relevante Antigen, gleichgültig, ob es sich um ein Tumor assoziiertes Antigen (TAA) oder ein bei Mikroorganismen, Viren, Pflanzen, oder durch diese und andere biologische Systeme produzierte Antigene (z.B. bakterielle, pflanzliche, oder von Pilzen herstammende Toxine) oder in nicht-biologischen Systemen vorkommende Antigene handelt.

Entsprechend der vielgestaltigen und flexiblen Kombinationsmöglichkeiten der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen, die eine der weiteren grundlegenden Vorteile darstellen, können beliebige Effektormoleküle oder Trigger- bzw. Aktivatormoleküle insbesondere für die Tumorimmuntherapie kombiniert und gleichzeitig, sequenziell oder konsekutiv oder, insbesondere betreffend Komponente 3, beliebig verzögert appliziert werden. Beispielsweise kann zur Behandlung von malignen Tumoren, wie zum Beispiel B-Zell Lymphomen bzw. chronisch lymphocytischen Leukämien, Melanomen, Ovarialkarzinomen, aktivierte autologe T-Zellen zur Lyse dieser maligen entarteten Zellen veranlaßt werden.
Die Aktivierung von "ruhenden" T-Zellen kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß für X in der Komponente 1 beispielsweise ein anti-CD3 Antikörper gewählt wird, welcher mit einer geeigneten Determinante Ha_1, beispielsweise ein Hapten, zum Beispiel 2,4-Dinitrophenyl (DNP) oder 2-Nitrophenyl (NP) ausgestattet bzw. haptenisiert wurde. Für Z kann ein anti-CD19 Antikörper gewählt werden, welcher beispielsweise haptenisiert ist mit einem Hapten Ha_2, welcher verschieden ist von

BNSDOCID: <WO___9808875A1_I_>

Ha_1, beispielsweise mit Digoxigenin (DIG) oder einem beliebigen anderen von Ha_1 verschiedenen Hapten. Entsprechend dieser Konstellation ist Y ein anti-Ha_1:anti-Ha_2 (anti-DNP:anti-DIG bzw. anti-NP:anti-DIG) bispezifischer Antikörper. Die Komponente 1 kann zusammen mit Komponente 2 oder auch getrennt wie bereits beschrieben, systemisch appliziert werden, wobei eine zeitlich von der Gabe von Komponenten 1 und 2 verzögerte Applikation von Komponente 3 bevorzugt wird. Gemäß BOHLEN, H. et al., Blood 82, 1803 - 1812, 1993, kann es von Vorteil sein, wenn zusätzlich zu der Verwendung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen eine Co-stimulierung der T-Zellen erfolgt, insbesondere durch eine zusätzliche, insbesondere systemische Gabe eines entsprechenden Antikörpers gegen ein Zelloberflächenantigen, beispielsweise ein monospezifischer anti-CD28 Antikörper. Mit solch einer Maßnahme konnte beispielsweise bei chronisch lymphocytischer Leukämie (CCL) *in vitro* gezeigt werden, daß es zu einer Aufregulierung von T-Zell Aktivierungsmarkern (CD25, CD38) und zur Cytotoxizität gegen autologe chronisch lymphocytische Leukämiezellen und allogenen B-Zellen kommt (BOHLEN, H. et al., 1993, *loc cit.*). Die Stimulierung der ruhenden T-Zellen mit einer solchen Kombination, insbesondere zusammen mit CD28 Antikörpern, führte vorzugsweise zur Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen, wobei die Induktion bis zum 14fachen gegenüber CD8 gesteigert war. Die für eine T-Zell Aktivierung hierzu benötigte Dosis kann zwischen 1 ng/ml und 1000 ng/ml an den entsprechenden Antikörpern (Komponenten 1 und 3 sowie dem zusätzlichen Antikörper, hier anti-CD28) liegen, insbesondere bei ca. 100 ng/ml.

Mit einer anderen erfindungsgemäßen Kombinationspräparation, der neben der vorgenannten Kombination (Ha_1—anti-CD3 und Ha_2—anti-CD19 für Ha_1—X bzw. Ha_2—Z) zusätzlich eine zweite Kombination der Gestalt Ha_1—anti-CD28 für Komponente 1 (Ha_1—X) und Ha_2—anti-CD22 für Komponente 3 (Ha_2—Z) sein kann, kommt eine weitere vorteilhafte Anwendung in Betracht, wobei Y die entprechende bispezifische Spezifität aufweist (BOHLEN, H. et al., Cancer Res. 53, 4310 - 4314, 1993).

Nach eigenen Befunden muß der Kombination CD3 x CD28 oder CD3 x CD19 für X und Z in Ha_1—X bzw. Ha_2—Z, gegebenenfalls in weiterer Kombination mit CD19 bzw. CD28 eine besonders vorteilhafte Wirkung bei der Immuntherapie von Tumoren, insbesondere von B-Zell Tumoren, zugesprochen werden. Eine derart bevorzugte erfindungsgemäße Kombinationspräparation besteht beispielsweise demnach darin, daß X in Ha_1—X ein anti-CD3 Antikörper und Z in Ha_2—Z ein anti-

BNSDOCID: <WO___9808875A1_I_>

CD28 oder ein anti-CD19 Antikörper ist, wobei für die Komponente 2 ein entsprechendes bispezifisches Reagenz gemäß anti-Ha_1—Y—anti-Ha_2 zu wählen ist. Für Ha_2 kommt sowohl ein monovalentes als auch ein bivalentes Hapten in Betracht. Bevorzugte Reagenzien für X und Y sind monoklonale Antikörper bzw. bispezifische monoklonale Antikörper mit den jeweiligen spezifischen Aktivitäten.

Die beschriebenen Verwendungen der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der Diagnostik als auch Therapie, zur Prophylaxe, zur Prognose und zur Bestimmung von Tumoren, sind natürlich nicht nur auf die beispielhaft genannten Tumoren beschränkt, sondern umfassen alle soliden und diffusen Tumore eines Säugetiers einschließlich des Menschen. Insbesondere epitheliale Tumore des Ektoderms und Entoderms, Karzinome, mesenchymale Tumore des Mesoderms, Sarkome, embryonale Tumore aus undifferenziertem Gewebe wie beispielsweise Nephroblastom, Neuroblastom, Medulloblastom, Retinoblastom, embryonales Rhabdomyosarkom, Teratom, endokrin aktive Tumore (mit Bildung von menschlichen Choriongonadotropin, HCG), interkranielle, neuroepitheliale, spinale Tumore, Melanome, Gliome, Tumore des lymphatischen Systems (Lymphome), Tumore des Blutgewebes (Leukämien). Ebenso nicht beschränkt ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen auf die in der vorliegenden Beschreibung ausgewählten Beispiele und Literaturzitate, sondern umfassen selbstverständlich und ohne Ausnahme alle dem Fachmann bekannten und literaturbeschriebenen Systeme des targetings, soweit diese mit Antikörper/Antigen-Wechselwirkungen verbunden sind.

Darüberhinaus eignen sich die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen zur Immunisierung, beispielsweise mit Tumorproteinen bzw. Tumorzellen (zum Beispiel Lymphomzellen). Für diese Zwecke kann Komponente 2 ein bispezifischer Antikörper mit anti-Ha_1:anti-Ha_2 bzw. anti-Ha_1:anti:Ha_n Spezifitäten, Komponente 1 ein mit einer Determinante Ha_1, vorzugsweise ein Hapten, ausgestatteter Idiotyp, beispielsweise Antigen-präsentierende Zellen, zum Beispiel dendritische Zellen, und Komponente 3 ein mit einer Determinanten Ha_2 oder mehreren Determinanten Ha_n, vorzugsweise Haptene, ausgestatteter Antikörper, beispielsweise ein gegen "human γ heavy chain" gerichteter Antikörper, sein. Ha_1 und Ha_2 können zum Beispiel DNP bzw DIG sein. Äquimolare Mengen der drei Komponenten können *in vitro* vermischt werden und der entstandene Komplex (X-Ha_1:anti-Ha_1—Y—anti-

BNSDOCID: <WO___9808875A1_I_>

Ha_2:Ha_2-Z) zur Immunisierung in einem Säugetierorganismus über die bekannten Routen, beispielsweise i.v. oder i.p., appliziert werden.

Das der Erfindung zugrundeliegende, in der vorliegenden Beschreibung detailiert und für den Fachmann in seinem ganzen Anwendungsspektrum verständlich beschriebene Prinzip der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen läßt klar erkennen, daß neben malignen Tumoren auch andere gegenüber einem gesunden Zustand von Zellen, Geweben und Organen pathologisch veränderte, auffällige und typische antigene Eigenschaften, die nach bekannten Verfahren erkannt werden können, gleichfalls mitumfaßt sind. Das betrifft insbesondere Infektionserkrankungen, die durch Viren, Bakterien, Parasiten, Mykoplasmen, Pilze verursacht werden und die weiteren in der vorliegenden Beschreibung angeführten mit pathologischen Zuständen assoziierten Antigene.
Aber auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen bei Autoimmunerkrankungen und Erkrankungen des Blutgerinnungssystems sowie die Verwendung zum Zweck einer Verhinderung von Abstoßungsreaktionen und zur Verhinderung oder Auslösung einer Immunsuppression werden umfaßt. Denn die detailiert beschriebenen Verwendungen der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen lassen sich auf einfache Weise auf diese Indikationsgebiete anwenden und analog übertragen.
Alle für die Ausführung der Erfindung relevanten Verfahren wie beispielsweise radioaktive Markierungen, das Haptenisieren, die Synthese von Antikörpern, Fragmenten und Derivaten davon, Assays, chemische Verknüpfungen von Liganden oder Synthesen von niedermolekularen Verbindungen sind dem Fachmann bekannt oder in der Literatur beschrieben. Dasselbe gilt für die Anwendungen selber, wobei diese mit den erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen in einfacher Weise auf die beschriebenen Methoden der konventionellen Systeme übertragen werden können.

Die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen sind auch vorteilhafterweise zum Zwecke einer Bestimmung aller möglichen Antikörper bei bekannten Antigenen und vice versa ebenso zur Bestimmung von Antigenen bei bekannten Antikörpern, beispielsweise in Form des Neutralisations- bzw. Agglutinations-Hemmtests, geeignet. Die Anwendung des erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen beschränkt sich daher nicht nur auf das Gebiet der Diagnostik von pathologischen Zuständen im engeren Sinne, sondern umfaßt allgemein das Suchen, Erkennen und

Bestimmen jedes beliebigen Antigens (Antigen-Screening und Antigen-Diagnostik) zum Erfassen bzw. Diagnostizieren eines physiologischen Zustandes biologischer Systeme, beispielsweise eines Säugetieres bzw. Menschen (z.B. Schwangerschaftsnachweis), eines nicht regelhaften Zustandes eines biologischen Systems, beispielsweise eines pathologischen körperlichen Zustandes bzw. einer Erkrankung eines Säugetieres bzw. Menschen (z.B. Tumordiagnostik, Infektionsdiagnostik) oder eines durch Einnahme von pharmakologisch wirksamen Wirkstoffen verursachten Zustandes (z.B. Medikamentenmißbrauch, Nachweis von Medikamenten- oder Drogenmetaboliten oder von Wirkstoff- oder Metabolitenakkumulationen, Halbwertszeitbestimmung von pharmakologisch wirksamen Stoffen, Bioverfügbarkeit und Clearance derselben, Medikamenten- oder Drogenabhängigkeit) in einem Säugetierorganismus bzw. in einem Menschen, soweit diese Zustände durch das Auftreten von für sie spezifischen Antigenen und/oder Antikörpern begleitet und gekennzeichnet sind. Darüber hinaus kann eine zu untersuchende Probe ein nicht-biologisches flüssiges Medium sein, soweit dieses agglutinierbare, markierbare oder detektierbare Antigene und/oder Antikörper enthält.

Aufgrund dieser Offenbarungen ergeben sich für den Fachmann demzufolge neue und vorteilhafte Verfahren zur Herstellung von für die Immunprophylaxe, Immuntherapie und für die Immunisierung verwendbaren pharmazeutischen Zubereitungen, welche die Schritte umfassen a) Bereitstellen mindestens einer Kombinationspräparation bestehend aus Komponente 1, 2 und 3 gemäß Tabelle 1, mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definitionen für X, Y, Z, Ha_1 und Ha_2 bzw. Ha_n, oder b) Bereitstellen mindestens einer Kombinationspräparation bestehend aus Komponente 1 und 2 gemäß Tabelle 1, mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definitionen für X, Y, Ha_1 und Ha_2 bzw. Ha_n, c) Identifizieren eines hinsichtlich seiner immunprophylaktischen oder immuntherapeutischen Eigenschaften oder seiner Immunisierungs-Eigenschaften biologisch, chemisch oder physikalisch wirksamen Mittels mittels der in a) und b) bereitgestellten Kombinationspräparationen über die oben offenbarten Bestimmungs- und Screening-Verfahren d) Formulierung des aus c) erhaltenen Mittels in Form einer Kombinationspräparation gemäß Tabelle 1, mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definitionen für X, Y, Z, Ha_1 und Ha_2 bzw. Ha_n, mit den bekannten Hilfs- und Trägerstoffen, oder d) Formulierung des aus c) erhaltenen Mittels durch Verbinden mit einem monospezifischen Reagenz,

welches an biologische Bindungsstrukturen zu binden vermag, nach bekannten Methoden und mit den bekannten Hilfs- und Trägerstoffen, oder e) Formulieren des aus c) erhaltenen Mittels für sich allein nach bekannten Methoden mit den bekannten Hilfs- und Trägerstoffen.

Das monospezifische Reagenz kann vorteilhafterweise ein Protein, ein Immunglobulin bzw. ein Antikörper oder ein Derivat oder Fragment davon, ein Ligand, ein Lectin, ein Rezeptorbindungsmolekül, ein Adhäsionsmolekül, ein Cytokin, ein Chemokin, ein Lymphokin sein. Die genannte biologische Bindungsstruktur ist definiert wie in der Beschreibung oder in den Patentansprüchen offenbart.

Es ist dem Fachmann somit auch klar, daß für die genannten Verfahren zur Herstellung der betreffenden pharmazeutischen Zubereitungen die Verwendung eines Mittels ganz besonders vorteilhaft ist, welches aus einer Kombinationspräparation besteht, umfassend die Komponenten 1, 2 und 3 gemäß Tabelle 1, mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definitionen für X, Y, Z, Ha_1 und Ha_2 bzw. Ha_n, oder bestehend aus einer Kombinationspräparation umfassend die Komponenten 1 und 2 gemäß Tabelle 1, mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definitionen für X, Y, Ha_1 und Ha_2 bzw. Ha_n, oder bestehend aus Komponente 2 gemäß Tabelle 1, mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definitionen für Z, in einem der oben angebenen Herstellungsverfahren für pharmazeutische Zubereitungen zum Zwecke der Immunprophylaxe, Immuntherapie oder von Immunisierungen.

Die aus den genannten Verfahren zur Herstellung von sowohl pharmazeutischen Zubereitungen für die Immunprophylaxe, Immuntherapie und für die Zwecke einer Immunisierung als auch von *in vitro* und *in vivo* zu verwendenden Immundiagnostika unmittelbar gewonnenen Verfahrensprodukte können nach bekannten Methoden formuliert und gegebenenfalls mit den bekannten Hilfs- und Trägerstoffen zusammen vermischt werden. Für die jeweilige Verwendungsart und für die Dosierung dieser Produkte steht dem Fachmann ein umfangreicher Stand der Technik zur Verfügung.

So kann gemäß dem erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren ein für einen bestimmten therapeutischen oder diagnostischen Zweck vorteilhaft erkanntes Mittel, zum Beispiel ein cytotoxisches oder cytolytisches Agens (beispielsweise ein

BNSDOCID: <WO___9808875A1_I_>

Antikörper oder ein Antikörperheterokonjugat) oder ein markiertes Antigen in PBS (Phosphat gepufferte Saline), beispielsweise in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 1000 µg/ml, aufgenommen bzw. gelöst werden oder es kann lyophilisiert werden, wobei das Lyophilisat nach bekannten Methoden in physiologischer Kochsalzlösung, PBS oder in sterilem Wasser rekonstituiert werden kann. Im allgemeinen kann davon ausgegangen werden, daß, beispielsweise in dem Fall, daß das als vorteilhaft erkannte Mittel ein Protein (zum Beispiel ein Antikörper) ist oder als Bestandteil in diesem Mittel vorliegt, im Mengenbereich zwischen 1 und 1000 µg verwendet wird.

Die erfindungsgemäß identifizierten Mittel bzw. die über die erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren bereitgestellten Mittel können ferner über geeignete Assays hinsichtlich ihrer Wirkungen und Eigenschaften weiter charakterisiert werden, wobei jeder *in vitro* oder *in vivo* Immunoassay in Betracht kommt. Beispiele hierfür wären ein *in vitro* Cytotoxizitäts-Assay (beispielsweise der "^{51}Cr release assay"), zum Beispiel gemäß RAMMENSEE; H.-G. et al., Eur. J. Immunol. 17:433 - 436, 1987, oder gemäß JUNG, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4497 - 4483, 1986, oder ein *in vivo* Antitumor-Assay wie beschrieben von beispielsweise GARRIDO, M. A. et al., Cancer Research 50:4227 - 4232, 1990.

Für die genannten Bestimmungs-, Screening- und Herstellungs-Verfahren werden erfindungsgemäß auch Kits zur Verfügung gestellt zur vorteilhaften Durchführung dieser Verfahren, wobei der Begriff "Kit" auch "kit of parts" umfaßt, und wobei diese Kits die folgenden Bestandteile enthalten können: a) die Komponenten 1, 2 und 3 gemäß Tabelle 1 mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definitionen für X, Y, Z, Ha_1 und Ha_2 bzw. Ha_n, oder b) die Komponenten 1 und 2 gemäß Tabelle 1 mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definitionen für X, Y, Ha_1 und Ha_2 bzw. Ha_n, oder c) die Komponente 2 gemäß Tabelle 1 mit den in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Definition für Y, oder d) Komponenten 1, 2 und 3 oder 1 und 2 oder 2, wie oben definiert, zusammen mit mindestens einer weiteren voneinander unterschiedlichen Komponente 3, gegebenenfalls zusammen mit Hilfs- und Trägerstoffen. Die im Kit d) vorgesehenen unterschiedlichen Komponenten 3 können hierbei hinsichtlich ihrer stofflichen Zusammensetzung und/oder hinsichtlich ihrer biologischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften verschieden sein.

Betreffend "inerte Partikel" sind diese insbesondere für diagnostische Zwecke (z.B. Immunassays) geeignet und umfassen alle die dem Fachmann bekannten Partikel, an denen Proteine oder Proteinfragmente adsorbiert werden können. Werden als Proteine beispielsweise Antikörper gewählt, können diese inerten Partikel damit derartig beladen werden, daß sie bispezifische oder multispezifische Eigenschaften annehmen und als partikuläre Formen eines bispezifischen oder multispezifischen Antikörper betrachtet werden können. Die Verwendung solcher Partikel hat den Vorteil, daß aufwendige chemische oder gentechnologische Verfahren zur Konstruktion von Antikörperheteroaggregaten, chimären Antikörpern oder "cross-linked" Antikörpern umgangen werden können. Derartige, mit Immunreagenzien beladene inerte Partikel bzw. an diese adsorbierte ("gecoatete") Antikörper sind dem Fachmann bekannt und im Stand der Technik beschrieben.

Als "inerte Partikel" im konkreteren Sinn sind Partikel zu verstehen, an die Antikörper oder Derivate oder Fragmente davon binden bzw. adsorbieren können. Zu diesem Zweck können alle dem Fachmann bekannten natürlichen, synthetischen, organischen oder anorganischen Partikel verwendet werden, an die Antikörper, Derivate und Fragmente davon adsorbiert werden können. Beispielsweise zählen dazu Blutzellen (Erythrozyten, wie zum Beispiel Toxocell IHA von Reditest,S.A.,Barcelona, oder Mast Serodia-Anti HBs FD 411 von Mast Diagnostica, Hamburg, oder gemäß BIRD, T. & STEPHENSON, J.H., J. clin. Path. 26, 623 - 627, 1973, oder Serodia-AFP von Fujizuki Pharmaceutical Co., Ltd., Japan), Latex bzw. Polystyrol-Kugeln (beispielsweise von Tokuyama Soda Co., Ltd., Japan, oder wie sie in der EP-A 0435851 oder von KOLBER M. A., J. Immunol. 143, 1461 - 1466, 1989, beschrieben sind), Mikroorganismen (Bakterien und Pilze, beispielsweise Salmonellen, Candida albicans oder Yersinia gemäß Yersinia Agglutube der Firma Labor Diagnostika GmbH, Heiden, Deutschland, oder Serratia gemäß SAUL, F. et al. Ärztl. Lab. 23, 407 - 411, 1977 (Blue-ASO-Test)), Bentonit (REISBERG, M.A. et al., J. Immunol. 105, 1151, 1970), Kohlenhydrate wie z.B. Zellulose (CAMPBELL, D.H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 37, 575, 1951; WELIKY, N. & WEETALL, H.H., Immunochemistry 9, 967, 1972), Sepharose (WILCHEK, M. et al., Biochemistry 10, 2828, 1971), Glasperlen (WEETALL, H.H., J. Biochem. 117, 257, 1970), Styrole und Derivate davon (EP-A 0466170), Liposomen, Metalloxidpartikel, Holzkohlepartikel, Gelatine (beispielsweise Serodia™ -HIV von Fujirebio Inc., Tokyo, Japan).

Proteine, beispielsweise Antikörper oder Fragmente davon, können an dem Fachmann bekannte inerte Partikel, beispielsweise Polystyrolkugeln, in für den Fachmann bekannter Weise dadurch gebunden werden, daß ein dem Fachmann bekannter, geeigneter Antikörper, beispielsweise von der American Type Culture Collection. Rockville, Maryland, USA, (ATCC), von Linscott's Directory of Immunological and Biological Reagents, 40 Glen Drive, Mill Valley, California, USA, 94941, oder aus anderen bekannten, kommerziellen Quellen öffentlich verfügbarer Antikörper (beispielsweise OKT3 [ATCC, Hybridom CRL8001], OKT4 [ATCC, Hybridom CRL8002] oder beschrieben in EP-A 0468 637) in einer geeigneten Lösung und unter geeigneten Bedingungen, beispielsweise $NaHCO_3$, bei Raumtemperatur mit Polystyrolkugeln inkubiert wird, wobei anschließend mit einer physiologischen Lösung (beispielsweise Phosphat gepufferte Saline, PBS) mit einem inerten Protein (beispielsweise Rinder Serum Albumin, BSA) gewaschen wird. Die größe der Polystyrolkugeln ist nicht kritisch. Ein Durchmesser dieser Polystyrolkugeln im µ-Bereich bzw. von ca. 1µ bis 20µ kann als üblicher Näherungswert betrachtet werden. Geeignete Polystyrolkugeln sind beispielsweise erhältlich von Polysciences, Warrington, PA, USA. Ein derartig mit beispielsweise einem bispezifischen Antikörper oder Derivat oder Fragment davon "gecoateter" inerter Partikel erhält somit die Eigenschaften eines bispezifischen partikulären Antikörpers und kann gemäß der Beschreibung und der Beispiele erfindungsgemäß verwendet werden.

Demzufolge werden auch in analoger Weise hergestellte inerte Partikel als Teil von Y in der Komponente 2 der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen von der Erfindung mitumfaßt.

Hinsichtlich des der vorliegenden Erfindung zugrundeliegenden Begriffs Immunogen bzw. Antigen werden alle diejenigen Substanzen umfaßt, die in einem Säugetierorganismus eine Immunantwort und somit eine Immunglobulin- (Antikörper-)synthese induzieren können. Insofern kann ein solches Antigen natürlichen Ursprungs sein, über DNA-Rekombination oder synthetisch oder semisynthetisch hergestellt worden sein oder Teile von diesen darstellen. Derartige Antigene können in biologischen Flüssigkeiten eines Säugetierorganismus einschließlich des Menschen extrazellulär, intrazellulär, transzellulär (third space) oder interstitiell vorkommen, wie beispielsweise Blut, Serum und Fraktionen davon, Exkremente (wie z.B. Urin, Faeces), Tränenflüssigkeit, Speichel, Amnionflüssigkeit, Gewebeflüssigkeit, Aszites, Samenflüssigkeit, Pleuraflüssigkeit, Cystenflüssigkeit,

BNSDOCID: <WO__9808875A1_I_>

Cerebralflüssigkeit, Eiter, Sekrete des Magen-Darm-Trakts, Liquor, Augenkammerflüssigkeit, Ödemflüssigkeit, pathologisch auftretende Flüssigkeiten bei beispielsweise Ileus oder Peritonitis, Sekrete, Zerebrospinalflüssigkeit, Plasma, Lymphe oder Flüssigkeiten, einschließlich solchen, die aus Gewebeextrakten erhalten werden und in Gewebe- und Zellkulturen vorkommen.

Es kommen insbesondere auch solche Antigene in Betracht, die assoziiert sind mit einer im Säugetierorganismus vorkommenden Zelle, einem Gewebe, einem Organ oder einem Syntheseprodukt davon oder die einem Krankheitszustand zugeordnet werden können, beispielsweise Immunoglobuline bzw. Antikörper im Sinne der oben gegebenen Definition, Proteine, Polypeptide, Oligopeptide, Hormone (z.B. Steroidhormone wie z.B. Östrogene, Gestagene, Androgene, Glukokortikoide, Mineralokortikoide, Cholecalciferole, Proteohormone, biogene Amine, Oxytozin, Vasopressin (ADH), Insulin, Glukagon, Parathormon, Kalzitonin, Erythropoetin, Prostaglandine, Gonadotropine wie z.B. luteinisierendes Hormon (LH), Choriongonadotropin (HCG bzw. β-HCG), Follikel stimulierendes Hormon (FSH), Prolaktin und andere Plazentahormone, Serotonin, Histamin, Bradykinin, Kallikrein, gastrointestinale Hormone, Schilddrüsenhormone, Katecholamine, Azetylcholin), Enzyme, Tumormarker bzw. Tumorantigene (wie z.B. karzinoembryonales Antigen (CEA), Renal Cell Carcinom Antigen (RAGE), Melanom Cell Antigen (MAGE), Tumorassoziiertes Antigen (TAA), alpha-1-Fetoprotein (AFP), CA 15-3, CA 19-9, CA-50, CA-125, Postata-spezifische saure Phosphatase (PAP), neuronspezifische Enolase (NSE), Bence-Jones-Protein, alkalische Phosphatase (AP), Prostata-spezifisches Antigen (PSA), Hormone endokriner Tumore, LDH, Gamma-GT, Neopterin, Ferritin.

Es kommen aber auch solche Antigene in Betracht, die von Viren, Prokaryonten und nicht zu einem Säugetier zugeordneten Eukaryonten abstammen oder Teile davon sind. Insbesondere Mikroorganismen wie Gram-negative und Gram-positiv Bakterien (beispielsweise der Familien bzw. Ordnungen Enterobacteriaceae [beispielsweise die Gattungen Escherichia, Salmonella, Shigella, Yersinia], Corynebacteriaceae, Spirochetales [beispielsweise die Gattungen Treponema, Leptospira, Borrelia], Pseudomonadaceae, Mycoplasmataceae [beispielsweise die Gattung Mycoplasma], Mikrococcaceae [beispielsweise die Gattung Staphylococcus], Chlamydiae, Bacillaceae [beispielsweise die Gattungen Bacillus, Clostridium], Lactobacillaceae [beispielsweise die Gattung Streptococcus], Neisseriaceae [beispielsweise die Gattung Neisseria], Spirillaceae [beispielsweise die

BNSDOCID: <WO___9808875A1_I_>

Gattung Vibrio], Brucellaceae [beispielsweise die Gattungen Hemophilus, Bordetella, Francisella], Actinomycetales [beispielsweise die Gattungen Mycobacterium, Actinomyces, Nocardia, Streptomyces], Rickettsiaceae [beispielsweise die Gattung Rickettsia], Chlamydiae [beispielsweise die Gattung Chlamydia]), Pilze und Sporen davon (beispielsweise *Candida*, *Cryptococcus*, *Blastomyces*, *Paracoccidoides*, *Coccidoides*, *Aspergillus*, *Histoplasma*), und die von den genannten Mikroorganismen synthetisierten Toxine bzw. Endo- und Exotoxine, ferner auf DNA- und RNA-Viren beruhenden Antigene, beispielsweise virale Capsidantigene oder Hüllproteine (zum Beispiel Hepatitis Viren und verwandte Antigene, wie zum Beispiel HBe, HBc, HBs, Pockenviren, Coxsackieviren, Echoviren, Myxoviren, Rhabdoviren, Togaviren, Reoviren, beispielsweise HIV, Tumorviren, Picornaviren, Herpesviren, Paramyxoviren, Rubellaviren, Mumpsviren, RS-Viren, Coronaviren), Endo- und Ektoparasiten, insbesondere Protozoen (wie bespielsweise Cestoden, Flagellaten, Amöben, Leishmania, Trichomonas, Trypanosoma, Sarcocystidae einschließlich Toxoplasma, Eimeriidiae, Plasmodium, Cryptosporiidae) und die davon synthetisierten Toxine und Metaboliten, Tumor-spezifische Proteine, einschließlich solcher von durch Tumorviren infizierten oder transformierten Zellen, die im entsprechenden Wirt eine Immunantwort hervorrufen. Mitumfaßt sind auch über die bekannten Methoden der DNA-Rekombination hergestellten Antigene, beispielsweise wie sie für Toxoplasma gondii in der EP-A 0431541 beschrieben sind, und über die bekannten synthetischen und semisynthetischen Verfahren herstellbaren Antigene. Aber auch Allergene sind hiervon mitumfaßt, da sie ebenso wie die beschriebenen Antigene die Antikörpersynthese in Gang setzen, insbesondere IgE, beispielsweise Milben oder Hausstaub.

Ferner sind Antigene auf Basis von Drogen und Medikamenten und Metaboliten davon (beispielsweise Opiate und Opioide, Kokain, Diazepine, Barbiturate, Paracetamol, Theophylline) und von chemisch hergestellten Toxinen mitumfaßt.

Aber auch Antigene pflanzlichen Ursprungs werden *per definitionem* mitumfaßt, beispielsweise Pollen assoziierte Antigene oder in Pflanzensäften gelöste antigen wirkende Substanzen.

Es kommen aber auch Antigene in Betracht, die in nicht-biologischen Systemen vorkommen und untersucht werden sollen. "Nicht-biologische Systeme" bzw. Untersuchungsproben können im Sinne der vorliegenden Erfindung Abwässer, Trinkwasser, stehende oder fließende Gewässer oder Grundwasser sein bzw.

solche, die nicht an das Vorkommen in biologischen Systemen oder Organismen, wie z.B. Zellkulturen oder einem Säugetierorganismus gebunden sind und nicht-lösliches, partikuläres immunologisch aktives Material im obigen Sinne enthält oder dieses in löslicher Form vorliegt und bei Bedarf im nachhinein in bekannter Weise an Partikel gebunden bzw. adsorbiert oder nach den bekannten Methoden entsprechend chemisch behandelt und entsprechend modifiziert bzw. polymerisiert werden kann.

Erfindungsgemäß umfaßt werden demzufolge auch *a priori* lösliche Antigene, die durch die bekannten Methoden unlöslich gemacht werden können, beispielsweise durch Polymerisation mit Ethylchlorkohlensäureester gemäß AVRAMEAS, S. & TERNYNCK, T., J. Biol. Chem. 242, 1651 - 1659, 1967, oder durch Verwendung von Glutaraldehyd nach AVRAMEAS, S. & TERNYNCK, T., Immunochemistry 6, 53, 1969, oder von Ethylenmaleinsäureanhydrid nach CENTENO, E.R. & SEHON, A.H., Immunochemistry 8, 887, 1971. Demzufolge kann die Verwendung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen nicht nur für *a priori* partikuläre Antigene oder für an inerte Partikel gebundene korpuskuläre Antigene Anwendung finden, sondern auch für *a priori* lösliche Antigene.

Unter dem Begriff "Hapten" versteht der Fachmann niedermolekulare Verbindungen, die an sich keine Antikörperproduktion hervorrufen und im allgemeinen ein Molgewicht von unter 1000 Dalton aufweisen. Werden solche Haptene an eine immunologische Reaktion auslösende Substanz (z.B. ein Protein) gebunden, können Antikörper erhalten werden, die spezifisch gegen das betreffende Hapten oder die betreffenden Haptene gerichtet sind. Beispiele für Haptene, die erfindungsgemäß zur Haptenisierung der betreffenden Komponenten der Kombinationspräparationen, sind 2-Nitrophenyl, Nitrophenylphosphat, Digitoxigenin, Digoxigenin, Cholinchlorid, Aminophenylphosphochloride, Glycerophosphocholin, Nitrophenylacetat, Trinitrophenyl, Trinitrophenylglycin, Dimethylsulfoxid, Guanidinhydrochlorid, 4-Hydroxy-3-nitrophenylacetat, 2,4-Dinitrophenyl, Benzyl-EDTA, um nur einige zu nennen. Derartige niedermolekulare, als Haptene geeignete Verbindungen und deren Herstellung sind dem Fachmann bekannt und sind auch allgemein kommerziell erhältlich, beispielsweise bei Sigma, Deisenhofen, Deutschland.

Haptenisierungen von X und Z können nach allen bekannten Methoden erfolgen, die dem Fachmann bekannt sind oder aus der Literatur entnommen werden können. Eine Haptenisierung mit beispielsweise einem Nitrophenylderivat (beispielsweise p-Nitrophenylphosphat) von X und Z kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß das betreffende Mittel, beispielsweise ein Protein (zum Beispiel ein Antikörper oder ein Fragment oder ein Derivat davon) in $NaHCO_3$ (beispielsweise 0,1 M, pH 8,5) in Gegenwart von NaCl (zum Beispiel 0.15 M) eingebracht wird. Ein Volumen von ca. 1 ml davon wird in 10 bis 100 µl von beispielsweise p-Nitrophenylphosphatcapronsäure-o-succinimidester (in einem aprotischen Lösungsmittel, beispielsweise Dimethylformamid, beispielsweise 20mg/ml) hinzugefügt. Nach ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur werden ca. 100 µl einer 1 M Ethanolaminlösung, pH 8,5, dazugegeben und gegen Phosphat gepufferte Saline (PBS), pH 7.3, dialysiert. Die Bindungsrate von Hapten:Protein kann anschließend photospektrometrisch aufgrund der unterschiedlichen Adsorptionen von Hapten und Haptenprotein bei verschiedenen Wellenlängen ermittelt werden.
Nach einer anderen Methode kann eine Haptenisierung des betreffenden zu haptenisierenden Proteins in dem entsprechenden aktivierten Ester, beispielsweise Nitrophenylphosphatcapronsäure-o-succinimidester, welches in einem aprotischen Lösungsmittel, beispielsweise Dimethylformamid, gelöst und in 0.1 M $NaHCO_3$, pH 8,5 (in Gegenwart von 0.15 M NaCl) suspendiert wird, erfolgen. Nach einer Reaktionszeit von ungefähr 1 Stunde bei Raumtemperatur ist die Haptenisierung abgeschlossen und das Material kann gegen PBS dialysiert werden.

Es soll an dieser Stelle betont werden, daß nicht nur die Verfahren des Haptenisierens dem Fachmann bekannt sind, sondern daß auch alle anderen zur Durchführung der vorliegenden Erfindung notwendigen Verfahren und Prozesse (Markierungen, Kopplungen, Konjugationen, Synthesen und Messungen) zum Stand der Technik gehören.

Unter zellulären Adhäsionsmolekülen sind Oberflächenmoleküle von Leukocyten zu verstehen, welche das Adsorbieren oder Andocken an zellulären Strukturen (Zellen, Geweben, beispielsweise Endothelzellen) vermitteln, um dort gegen körperfremde Stoffe und Partikel (beispielsweise Bakterien, Viren, Pilze, veränderte Zellen) co-stimmulierend im Zusammenspiel mit weiteren Faktoren (beispielsweise $CD8^+$ Lymphocyten) zu wirken, indem die betreffende Zelle lysiert wird.

Derartige Oberflächenmoleküle von T-Zellen sind bekannt. Beispielsweise das auf den meisten Lymphocyten befindliche Heterodimer "Lymphocyte Function-associated Antigen-1" (LFA-1) oder das auf Macrophagen, Granulocyten und Lymphocyten lokalisierte Heterodimer Mac-1. Solche Oberflächenmoleküle besitzen eine entscheidende Funktion bei der Zelladhäsion und gehören zur Familie bestimmter Glykoproteine (KEIZER, G., et al., Eur. J. Immunol. 15, 1142 - 1147, 1985) mit einer α-Kette und einer β-Kette (SANCHEZ-MADRID, F. et al., J. Exp. Med. 158, 1785 - 1803, 1983), letztere ist auch als CD18 bekannt. Derartige Adhäsionsmoleküle werden gemäß der Definition des oben dargestellten Schema's in Tabelle 1 von der Erfindung mitumfaßt (Komponente 1) - aber auch Liganden, die an LFA-1 binden, wie beispielsweise interzelluläre Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (CD54) oder ICAM-2, welche als Mitglieder zu der Immunoglobulin Superfamilie gerechnet werden, sowie Derivate und Fragmente davon. Es ist bekannt, daß beispielsweise ICAM-1 auf der Oberfläche von endothelialen Zellen lokalisiert ist. Wenn beispielsweise in Komponente 1 X im oben angegebenen Schema ein gegen ein solches Adhäsionsmolekül, ein Derivat oder ein Fragment davon, gerichteter mit einem Hapten Ha_1 verbundener Antikörper ist, Y ein gegen zwei Haptene bispezifisches Reagenz mit anti-Ha_1 und anti-Ha_2 Eigenschaften und Z ein mit einem Hapten Ha_2 verbundenes Reportermolekül (beispielsweise ein Enzym, Farbstoffmolekül, Radioisotop), kann damit ein gezieltes targeting zur Lokalisierung von Infektionsorten und Entzündungsstellen erfolgen, da bekannt ist, daß solche Liganden (beispielsweise ICAM-1) an derartigen Orten exprimiert werden.

Es ist bekannt, daß CD28 nur von etwa der Hälfte aller $CD8^+$ Lymphocyten exprimiert wird, demgegenüber exprimieren praktisch alle $CD4^+$ Lymphocyten CD28 (LINDSLEY, P. S. & LEDBETTER, J. A., Annu. Rev. Immunol. 11, 191 - 212, 1993). Es konnte festgestellt werden, daß die durch bispezifische monoklonale Antikörper bedingte Cytotoxizität überwiegend durch $CD8^+$ Lymphocyten und Effektorzellen vermittelt wird und das die Blockierung des LFA-1/ICAM-1 oder CD2/LFA-3 Adhäsionswegs diese Cytotoxizität herabsetzt. Daher haben Adhäsionsmoleküle eine entscheidende Funktion als Co-Stimulatoren bei durch bispezifische monoklonale Antikörper aktivierte T-Lymphozyten, wodurch eine Verstärkung der Signalübermittlung durch die CD3/TCR und CD28 Wege erfolgt. Daraus ergibt sich eine weitere therapeutische Verwendung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen, die darin besteht, daß Z in Ha_1—Z ein Adhäsionsmolekül ist, X in Ha_1—X eine T-Zell aktivierende Komponente und Y anti-

Ha_1:anti-Ha_2 Spezifitäten aufweist. Mit solch einem System können Krankheitszustände, die mit einer Defizienz von Adhäsionsmolekülen, beispielsweise ICAM-1 oder ICAM-2, einhergehen therapiert oder diagnostiziert werden, wobei die oben beschriebenen Applikationsweisen für diese Zwecke zu übertragen sind.

Die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen können in flüssiger oder fester Form vorliegen und in Flaschen, Ampullen oder anderen dazu äquivalenten Behältern, vorzugsweise in solchen aus Glas oder Kunststoffen, gefüllt und verpackt werden.

Hinsichtlich des Vorliegens der Komponenten1, 2 und 3 der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen in flüssiger Form sind die dem Fachmann bekannten Puffer und Medien verwendbar, gegebenenfalls zusammen mit einem Stabilisierungsmittel. Entsprechend eignen sich zum Beispiel Tris-, Phosphat- (beispielsweise Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, PBS) oder Carbonat-Puffer, steriles Wasser, einfach- oder bidestilliertes Wasser oder physiologische Kochsalzlösungen. Als Stabilisierungsmittel eignen sich die bekannten und üblichen Zusätze, wie beispielsweise Albumine oder Serumalbumine (Rinderserumalbumin [RSA], Humanserumalbumin [HSA]) oder andere inerte Proteine, aber auch Biozide. Für die veterinär- und humanmedizinische Anwendung kommen natürlich nur die genannten und dem Fachmann bekannten toxikologisch unbedenklichen und physiologisch inerten Zusatzstoffe und Stabilisierungsmittel in Frage.

Die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen bzw. die Teile davon können aber auch in lyophilisierter Form vorliegen, wenn sie als Produkt in fester Form bestehen. In solchen Fällen können die dem Fachmann bekannten Techniken der Lyophilisation und der vor der Verwendung der entsprechenden Antikörper durchzuführenden Rekonstitution (beispielsweise mit einem der genannten Puffer und Medien) angewandt werden.

Bevorzugt wird für die Komponenten 1, 2 und 3 dann die lyophilisierte Form, wenn diese als für die Lyophilisierung zugängliche Substanzen vorliegen. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn Komponenten 1, 2 und 3 ein Protein sind oder ein mit einem Farb- und/oder eine Effektorsubstanz (beispielsweise ein Radioisotop, ein Reportermolekül, ein Kontrastmittel) verbundenes Protein. Die Rekonstitution kann vorzugsweise mittels sterilem Wasser für Injektionszwecke oder mit PBS, beispielsweise pH 7.0 - 7.2, durchgeführt werden.

BNSDOCID: <WO___9808875A1_I_>

Allgemein können die einzelnen Komponenten jedoch ohne Einschränkungen nach den bekannten Methoden formuliert werden, wie sie in der pharmazeutischen Chemie verwendet werden und bekannt sind. Grundsätzlich sind die einzelnen Komponenten in allen bekannten physiologisch unbedenklichen, vorzugsweise sterilen, Flüssigkeiten lösbar oder suspendierbar, soweit diese für die parenterale Applikation geeignet sind, wie beispielsweise physiologische Saline (PBS), Wasser für Injektionszwecke.

Die für die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen bzw. Teilen davon geeigneten Träger und ihre Formulierungen, beispielsweise human Serumalbumin (HSA) sind beschrieben, beispielsweise in Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed. (Osol, A., Ed.), 1980.

Zusätzlich können auch pharmazeutische Verfahren verwendet werden, um die Dauer der Wirkung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen zu steuern. Präparationen zur gesteuerten oder kontrollierten Freisetzung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen (kontrollierte Wirkstoff-Freigabe) können durch Verwendung von Polymeren erhalten werden, an die die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen (zum Beispiel die entsprechenden Proteine oder Antikörper oder Teile davon) adsorbieren oder komplexieren können. Die kontrollierte Freisetzung kann dann durch die Auswahl der zur Verfügung stehenden Polymere bzw. Makromoleküle, beispielsweise Polyester, Polyvinyl, Polyaminosäuren, Methylcellulose, Carboxymethylcellulose, Pyrrolidon, Ethylenvinylacetat, erreicht werden. Darüberhinaus können die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen in Partikel inkorporiert werden, wodurch ebenfalls eine kontrollierte Freisetzung bzw. Wirkstoff-Freigabe erreicht werden kann. Die betreffenden Partikel sind für diesen Zweck aus polymeren Materialien auszuwählen, beispielsweise Polyester, Hydrogele, Polyaminosäuren, Polymilchsäure. Ebenfalls möglich ist, solche Effekte durch Mikroverkapselung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen zu erreichen. In solch einem Fall bieten sich die bekannten Verfahren (zum Beispiel Koazervation) mit beispielsweise Hydroxymethylcellulose oder Mikroverkapselungen in Gelatinekapseln oder Methylmethacrylat bzw. Polymethylmethacrylat oder kolloidale Syteme, beispielsweise Liposomen, Mikrospheren (Zum Beispiel Albumin), Emulsionen. Solch Verfahren sind dem Fachmann bekannt und können aus Remington's Phramaceutical Sciences, 1980, entnommen werden.

Die gebrauchsfertigen Formulierungen finden bevorzugt dann Anwendung, wenn die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen für *in vivo* Zwecke angewendet werden sollen. Für *in vitro* Zwecke sind natürlich gleiche oder äquivalente Formulierungen geeignet, wobei hier die physiologische Unbedenklichkeit keine derartige Bedeutung hat.

Als beispielhafte Richtlinie kann davon ausgegangen werden, daß die entsprechenden Lyophilisate der Komponenten 1, 2 und 3 im Verhältnis 1:10 (ml wässrige Lösung/mg der jeweiligen Komponente) gelöst werden können. Beispielsweise kann eine gebrauchsfertige Formulierung darin bestehen, daß je 10 mg der jeweiligen Komponente1, 2 oder 3, bzw. äquimolare Mengen davon, vorzugsweise wenn X, Y oder Z ein Protein ist, in jeweils 1 bis 10 ml PBS, pH 7.2, gelöst werden; oder es können je 5 mg je Komponente, bzw. äquimolare Mengen davon, in 0.5 bis 5 ml sterilem Wasser für Injektionszwecke gelöst werden.

Die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen liegen entweder in gebrauchsfertiger Verdünnung oder Konzentration vor oder sie können nach Belieben weiter verdünnt oder ankonzentriert werden, wobei der Fachmann weiß, welche individuelle Konzentration oder Verdünnung er abhängig von seinem Verwendungszweck einsetzen möchte.

Beispielsweise können X, Y oder Z gemäß Tabelle 1, insbesondere wenn diese Komponenten Proteine, beispielsweise Antikörper sind, in einem Titerbereich von 1 : 1 bis 1 : 10.000, beispielsweise 1 : 10 bis 1 : 1000, insbesondere um den Bereich von 1 : 100 vorliegen. Dosierungen von 0.1 bis 200 mg, insbesondere 1 bis 50 mg kommen je nach dem Zweck der Verwendung und den dem Fachmann bekannten Anwendungsweisen in Betracht. Zur Verdünnung der Antikörperkonzentration können die oben genannten Puffer und Medien oder sterilen wässrigen Lösungen verwendet werden, beispielsweise PBS, Kochsalzlösungen oder Wasser.

Die Art und Weise der Verabreichung bzw. Anwendung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen in Form von Komponenten 1, 2 und 3 für die *in vitro* oder *in vivo* Diagnostik und für die medizinisch/klinische Zwecke (therapeutisch oder prophylaktisch oder zum Zweck einer Immunisierung) ist zudem in der Beschreibung einschließlich dem darin zitierten Stand der Technik zur Illustration dargestellt und kann ausführlich aus der bekannten Literatur entnommen werden, sodaß die Anwendungen und Verabreichungen für die genannten Zwecke dem Fachmann ohne weiteres möglich sind. Spezielle Dosierungen und Anwendungsmodalitäten hängen von individuellen Gegebenheiten ab, wie sie in der

vorliegenden Beschreibung und in der Literatur beschrieben sind und sind somit ebenfalls dem Fachmann bekannt. Insbesondere hinsichtlich der medizinisch/klinischen Anwendungen *in vivo* für die Diagnostik, Therapie und Immunisierung, einschließlich der Prophylaxe, kommt für die Verabreichung das gesamte dem Fachmann bekannte Spektrum ohne Einschränkungen in Betracht. Beispielsweise kann die Verabreichung der Komponenten 1, 2 oder 3 der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen gemäß Tabelle 1 intravenös, intraarteriell, intraperitoneal, intrapleural, intrathecal, subcutan, durch Perfusion, beispielswiese über einen Katheter, oder durch Injektion, beispielsweise mittels einer Spritze, systemisch oder lokal, beispielsweise durch direkte intraläsionale Injektion oder durch Injektion in die Nähe des zu behandelnden Organs oder Gewebes, erfolgen.

Im allgemeinen wird die Applikation in Form einer sterilen wässrigen Lösung, wie oben beschrieben, durchgeführt. Für die einzelnen Komponenten 1, 2 und 3 bzw. für X, Y und Z gemäß Tabelle 1 können Mengen im ng-, µg- oder mg-Bereich zur Anwendung kommen, je nach Art und Weise der zu therapierenden Erkrankung. Für die *in vitro* Anwendungen können die Dosen im ng- und µg-Bereich liegen, wohingegen für die *in vivo* Anwendungen Dosierungen im µg- und mg-Bereich in Betracht kommen können, abhängig von der Ansprechrate oder Wirkung, der Erkrankung und der Reaktionen der behandelten Patienten auf die Verabreichungen. Der Fachmann weiß aufgrund dieser Parameter, wann die Dosierungen zu erniedrigen sind oder wann sie erhöht werden müssen. Im allgemeinen kann in diesen Fällen für die einzelnen Komponenten von Dosierungen zwischen 0.5 bis 200 mg, insbesondere zwischen 5.0 und 100 mg ausgegangen werden.

Auch die Applikationsrouten hängen ab von der Art, Lokalisation und den Grad der Erkrankung. Bei beispielsweise Lungen- und Brusttumoren oder bei leukämischen Tumoren oder Entzündungerkrankungen oder zur Verhütung von Abstoßungsreaktionen ist vorzugsweise die intravenöse, intraarterielle oder intrapleurale Gabe anzuwenden. Die intraperitoneale Verabreichung kommt vorzugsweise für Ovarialtumore oder bei Erkrankungen des Peritoneums in Betracht. Bei Tumoren und entzündlichen Erkrankungen des Gehirns kann insbesondere die intrathecale und intravenöse Applikation in Betracht kommen. Subcutane Gaben werden beispielsweise bei Hautläsionen, Morbus Hodgkin oder bei Lymphomen anzuwenden sein.

Perfusionen mittels eines Katheters können vorzugsweise dann in Betracht kommen, wenn metastasierende Tumore, beispielsweise der Lunge, der Brust oder

BNSDOCID: <WO___9808875A1_I_>

der Leber zu b handeln sind. Bei lokal bzw. isoliert zu behand lnden Erkrankungen von Gliedmaßen oder von Organen kann die isolierte Perfusion nach bekannten Methoden erfolgversprechender sein als beispielsweise eine systemische intravenöse Applikation.

Die Komponenten 1, 2 und 3 der erfindungsgemäßen Kombinationspräparate können als räumlich getrennte Bestandteile in Form einer Verpackungseinheit vorliegen, insbesondere als Kit oder Kit-of-parts, oder Komponenten 1 und 2 können in einer Packungseinheit zusammen von Komponente 3 räumlich getrennt vorliegen.

Legenden zu den Figuren

Fig.1: Prinzipielle schematische Darstellung der erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen.
a) Herkömmliches System mit bispezifischen Reagenzien (BiAb), welche spezifisch einen Zielort (T) mit einer Bindungsstelle BS_1 und ein Effektormolekül (EM) mit einer Bindungsstelle BS_2 über die anti-BS_1 und anti-BS_2 Bindungsstellen verbindet.
b) Erfindungsgemäße Kombinationspräparation, wobei in diesem Fall X beispielhaft für einen Antikörper steht. Ein monospezifischer, mit einer Determinante Ha_1 ausgestattetes Reagenz $R_{(X)}$ bindet spezifisch an einen Zielort (T). Mit der Determinante Ha_1 reagiert der eine anti-Ha_1 Teil des bispezifischen Reagenz ($BiAb_{(Y)}$), der andere anti-Ha_2 Teil mit einem wirksamen oder detektierbaren Mittel, beispielsweise einem Effektormolekül $EM_{(Z)}$, welches eine Determinante Ha_2 trägt, wobei $Ha_1 \neq Ha_2$ ist und Ha_1, Ha_2, T, $R_{(X)}$ $BiAb_{(Y)}$ und $EM_{(Z)}$ definiert sind gemäß Ha_1, Ha_2, T, X, Y und Z wie in Tabelle 1.

Fig.2: ELISA Darstellung gemäß Beispiel 7. Die Graphik zeigt das Absorptionsspektrum bei 405 nm nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur.
I = Die mit IgG4 beschichtete Platte wurde wie beschrieben geblockt, mit haptenisierten Ziege anti-Human Antikörpern inkubiert und im Anschluß mit Komponente 2 (anti-DNP:anti-DIG bispezifische Antikörper) inkubiert. Im nächsten Schritt wurde haptenisiertes Enzym zugegeben und nach dem Waschen mit Substrat inkubiert.

II = wie I, jedoch ohne anti-DNP:anti-DIG bispezifischen Antikörper.

III = wie I, jedoch ohn Ziege anti-human Antikörper.

Fig.3: Durchflußzytometrische Analyse. Die B-Zellen wurden mit haptenisierten CD19 Antikörpern inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit dem anti-DNP:anti-DIG bispezifischen Antikörper inkubiert und nach zweimaligem Waschen mit haptenisierten FITC gefärbt.
A: alle Komponenten zugefügt, (anti-CD19-[Hapten], bispezifischer Antikörper, [Hapten)-FITC]).
B: kein haptenisierter CD19 Antikörper, (bispezifischer Antikörper, [Hapten]-FITC).
C: kein bispezifischer Antikörper, (anti-CD19-[Hapten], [Hapten]-FITC).
D: Irrelevanter Erstantikörper; (anti-CD3-[Hapten], bispezifischer Antikörper, [Hapten]-FITC)

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher beschreiben, ohne sie einzuschränken.

Beispiel 1 Herstellung des mit 2,4-Dinitrophenol konjugierten Proteins Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH-DNP) als Komponente 1

1.1. Dialyse von Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)

Ein Dialyseschlauch einer Länge von 15 cm, der Größe 3-20/32'' und einem Durchmesser von 15.9 mm (Firma Faust, Köln, Deutschland) wurde für 15 Minuten in 1 Liter destillierten Wasser (dH_2O) (Fresenius, Deutschland) mit 2 mM EDTA (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) getaucht. Danach wurde diese Lösung abgegossen und der Dialyseschlauch für weitere 15 Minuten in 1 Liter dH_2O, 1 mM EDTA, langsam gerührt. Anschließend wurde der Dialyseschlauch mit dH_2O gespült und in einer wässrigen Natriumazidlösung (0.02% Natriumazid (Sigma) in dH_2O) bei 4°C gelagert. KLH wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in einem Dialysevolumen von 15 ml 3 mal gegen 0.1 M Natriumhydrogencarbonat, pH 8,0 (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 1 Stunde bei Raumtemperatur für je 1 Stunde bei Raumtemperatur und danach 1 mal über Nacht bei Raumtemperatur dialysiert.

1.2. Haptenisierung von KLH mit 2,4-Dinitrophenol (DNP)

Die Kopplung von DNP an KLH (Boehringer Mannheim, Deutschland) wurde nach bekannten Methoden durch Veresterung mit einem aktivierten Succinimidester durchgeführt. Es wurde 3-Iodo-4-hydroxy-5-nitrophenyl-caprionsäur Succinimidester (Nip-cap-OSuc, MG 420) (Cambridge Research Biochemicals, U.K.) in einer Konzentration von 1 mg/ml in N,N-Dimethylformamid (DMF) (Merck) gelöst. Das dialysierte KLH und NIP-cap-OSuc wurde in einem Konzentrationsverhältnis von 10:1 (entsprechend einem Molekülverhältnis von 40:1) zusammengegeben, wobei erreicht wird, daß jedes KLH Molekül mit mindestens einem NIP-cap-OSuc Molekül gekoppelt wird. Die Kopplungsreaktion fand innerhalb von zwei Stunden bei Raumtemperatur statt, wobei die Reaktionslösung mit einem Schüttler (DPC® Micromix 5, Gwynedd, Wales. UK) bewegt wurde. Anschließend wurde die Reaktionslösung 3 mal gegen 1 Liter Phoshat gepufferte Saline, pH 7,0 (PBS) für je 2 Stunden bei Raumtemperatur dialysiert, um Reste von DMF und ungekoppelten Nip-cap-OSuc zu entfernen. Danach wurde die Kopplung mit einem ELISA nachgewiesen. Zur weiteren Lagerung wurde das KLH-DNP Konjugat steril gefiltert (Filter: 3µ, Millipore) und kurzfristig bei 4°C, für längere Lagerungen bei -20°C aufbewahrt.

Beispiel 2 Haptenisierung des monospezifischen Antikörpers OKT3 (anti-CD3) mit 2,4-Dinitrophenol (anti-CD3—DNP)

2.1. Dialyse des monoklonalen, monospezifischen Antikörpers OKT3

Die Dialyse des OKT3 Antikörpers (anti CD3, ATCC CRL 8001, Proc.Nat.Acad.Sci.,USA77:4914-4917,1980, U.S. Patent 4,361,549) erfolgte gemäß Beispiel 1.1.

2.2. Haptenisierung von OKT3 mit 2,4-Dinitrophenol (DNP)

Die Haptenisierung von OKT3 mit DNP wurde auch hier durch Veresterung mit einem aktivierten Succinimidester durchgeführt, wobei gemäß Beispiel 1.2. vorgegangen wurde. Dazu wurde die gemäß Beispiel 2.1. dialysierte Antikörper-Lösung (1mg/ml) mit NIP-cap-OSuc in einem Konzentrationsverhältnis von 10:1

(entsprechend einem Molekülverhältnis von 40:1) zusammengegeben und wie in Beispiel 1.2. beschrieben weiterverfahren.

2.3. Nachweis von OKT3(anti-CD3)-DNP monoklonalen Antikörper im ELISA

Als ungekoppelter Fangantikörper wurde ein polyklonaler Ziege anti-Mouse IgG (Southern Biotechnology Association, Inc (SBA)., Birmingham, U.S.A.), mit H- und L-Ketten, verwendet. Dieser Antikörper wurde auf einer 96 Lochplatte (Immuno Maxisorp F96, Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland) durch Bindung an die Plastikoberfläche mit einer Konzentration von 5 µg Antikörper pro ml PBS (Gibco BRL, Gaithersburg, U.S.A.) und 50 µl pro Loch bei 4°C über Nacht immobilisiert. Die freien Bindungsstellen der Plastikoberfläche wurden durch 100 µl PBS mit 10% Rinder Serum Albumin (BSA, Sigma, Deisendorf, Deutschland) pro Loch bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten und Raumtemperatur abgesättigt, um eine unspezifische Bindung weiterer Reagenzien zu verhindern. Der OKT3-DNP Antikörper wurde in den Verdünnungen 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05 und 0.01 mg/ml in PBS/1%BSA und den entsprechenden positiven Kontrollen (gleicher Isotyp, DNP-gekoppelt) und negativen Kontrollen (anderer Isotyp, nicht DNP gekoppelt) auf die Platte pipettiert. Das Volumen betrug 50 µl pro Loch und die Inkubationszeit 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 3 mal mit 250 µl PBS/1%BSA pro Loch gewaschen. Anschließend wurde der Überstand des anti-DNP Antikörpers (IgG_{2a}/λ) in der Verdünnung 1:10 hinzupippetiert und für 30 Minuten inkubiert. Nach 3 maligem Waschen in PBS/1%BSA wurde ein Peroxidase - gekoppelter Antikörper (Ziege anti-Maus Lambda (Southern Biotechnology Association, Inc. Birmingham, U.S.A.) in der Verdünnung 1 : 2500 in PBS mit 1% BSA und 50 µl Substratpuffer (10 ml 55 mM Citronensäure, pH 4,0, 100 µl 2,2'-Azino-bis[3-Ethylbenzthiazolin]-6-sulfonsäure (ABTS) (Stocklösung: 15 mg/ml), 3,3 µl H_2O_2 (33%ig) pro Loch hinzugegeben und für mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die enzymatische Farbreaktion (ABTS) wurde im ELISA-Reader bei 405 nm (Titertek Multiscan® Plus MK II, Flow Laboratories, U.S.A.) gemessen. Die genaue Inkubationszeit des Substrates richtete sich nach der Reaktionsgeschwindigkeit und hatte einen OD-Wert von 1.0 nicht überschritten, sodaß ein linearer Meßbereich gewährleistet war.

Beispiel 3: Herstellung ein s bispezifischen anti-2,4-Dinitrophenyl:anti-Digoxigenin Antikörpers als Komponente 2

3.1. Immunisierung von Mäusen mit 2,4-Dinitrophenol (DNP) und Digoxigenin (DIG)

Zur Immunisierung von Balb/c Mäusen wurden die beiden Haptene 2,4-Dinitrophenol (DNP) und Digoxigenin (DIG) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) mittels Glutaraldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) zur Bildung von KLH-Konjugaten mit Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) (Boehringer Mannheim, Deutschland) kreuzvernetzt. Dazu wurden jeweils 1,0 mg DNP und 1,0 mg DIG mit 5,0 mg KLH in einem Mol-Verhältnis von 1 : 3 in 0.1 M Na_2HPO_4, pH 8,3, gelöst und zusammen mit 0,05% Glutaraldehyd auf einem Schüttler (DPC® Micromix 5, Gwynedd, Wales, UK) für 30 Minuten bei 21°C (Raumtemperatur) inkubiert. Ein Volumen von 2,0 ml dieser Lösung wurde in einen Dialyseschlauch (15 cm Länge, Größe 3-20/32'', Durchmesser 15,9 mm, Firma Faust, Köln, Deutschland) gegeben und bei 4°C für 1 Stunde gegen 0,5 Liter 0,1 M NH_4Cl dialysiert, wobei die Reaktion gestoppt wurde. Die entsprechenden DNP- bzw. DIG-Konjugate wurden gegen 2,0 Liter PBS bei 4°C für 3 Stunden dialysiert. Anschließend wurden jeweils 50 µg Konjugat zusammen mit komplettem Freund'schen Adjuvanz F-5881 (Sigma) in einem Gesamtvolumen von 100 µl pro Maus (Balb/c) intraperitoneal injiziert. Diese Immunisierungen wurden in wöchentlichen Intervallen insgesamt 2 mal wiederholt, wobei die letzte Immunisierung in komplettem Freund'schen Adjuvanz durchgeführt wurde.

3.2. Polyethylenglykol-Fusion und Isolierung von anti-DNP und anti-DIG Antikörper produzierende Hybridome

Drei Tage nach der letzten Immunisierung gemäß Beispiel 3.1. wurden Myelomzellen (Sp2/0, ATCC CRL 1581) und Milzzellen der sowohl mit DNP als auch mit DIG immunisierten Mäuse in einem Verhältnis von 1:2 durch Polyethylenglykol (PEG)-Fusion (PEG 4000, Boehringer Mannheim, Deutschland) in RPMI 1640 Medium (Gibco BRL) nach bekannten Methoden wie folgt fusioniert: 50 x 10^6 Sp2/0 Myelomzellen und 10 x 10^7 Milzzellen, letztere wurden vorher mechanisch homogenisiert, wurden zusammengegeben. Der Ansatz wurde dann zwei mal in RPMI 1640 Medium zur Entfernung von Proteinkomplexen gewaschen (400 x g, 5 Minuten, dann 200 x g, 5 Minuten, jeweils bei 21°C). Auf das

erhaltene lockere Zellpellet wurde unter leichtem Schütteln 37°C warmes PEG (PEG 4000, Boehringer Mannheim, Deutschland) (1.0 ml) zupipettiert. Der Fusionsansatz wurde dann langsam auf 50 ml mit RPMI 1640 aufgefüllt und bei 200 x g bei Raumtemperatur für 5 Minuten abzentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde noch einmal wiederholt, bevor der Fusionsansatz in 36 ml Selektionsmedium bzw. HAT-Medium (RPMI 1640 mit Glutamax I(Gibco BRL), 10% fötales Kälberserum (FCS), dekomplementiert für 30 Minuten bei 56°C (Gibco BRL), 0,1% Ciprofloxacin (Bayer AG, Deutschland), $5x10^{-3}$ M Hypoxanthin, $2x10^{-5}$ M Aminopterin, $8x10^{-4}$ M Thymidin) aufgenommen wurde.

3.3. Selektion von Hybridomen durch HAT-Sensitivität und Iodoacetamid

Die Herstellung von Defektmutanten mit HGPRT-Defekt (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) der jeweiligen DNP- und DIG-Hybridome erfolgte zur Selektion der gebildeten Hybridome und zur Verhinderung des Wachsens nicht-fusionierter Parentalzellen. In Gegenwart von 8-Azaguanin können nur die HGPRT-Defektmutanten überleben.

Es wurden 2×10^8 Zellen von DNP-Hybridomen in 650ml Kulturflaschen mit HAT-Medium in Gegenwart von 8-Azaguanin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) mit einer Endkonzentration von $1,32 \times 10^4$ M für 3 Tage bei 37°C kultiviert. Danach waren mehr als 99% der Zellen abgestorben. Diese 8-Azaguanin Kultivierung wurde 2 mal wiederholt. Abgestorbene Zellen wurden gegenüber den überlebenden Zellen dadurch bestimmt, daß die jeweilige homogene Zellsuspension je nach Zelldichte mit 2 bis 10 Teilen Trypanblau (0,05 mg/ml; ICN Biochemical GmbH, Meckenheim, Deutschland) verdünnt wurde. Nach 1 Minute wurden 10µl der gefärbten Zellen in eine Neubauer-Zählkammer (Faust, Köln, Deutschland) pipettiert und 16 Felder innerhalb eines Quadrates ausgezählt. Der Kammerfaktor betrug 10^4 und ein Quadrat hatte ein Volumen von 0,1 µl. Eine Kontrolle in HAT-Medium wurde durchgeführt, um 8-Azaguanin resistente Zellen durch Wachsen in diesem Medium auszuschließen.

Die Immunglobulinproduktion der nach der 8-Azaguanin Kultivierung überlebenden Hybridome wurden im ELISA überprüft und anschließend subkloniert.

In Analogie zu den DNP-Hybridomen wurden Defektmutanten der DIG-Hybridome isoliert.

Für den ELISA wurde gemäß Beispiel 2.3. vorgegangen mit dem Unterschieden, daß als Fangantikörper ein Ziege anti-Maus anti-κ und anti-λ in einer Konzentration

von 5 µg/ml vorlag, daß keine Überstände des anti-DNP Antikörpers bzw. des DIG-Antikörpers hinzupippetiert und inkubiert wurden und daß das Ziege anti-Maus IgG Meerrettichperoxidase Konjugat 1:2000 verdünnt wurde. Die anti-DNP und die anti-DIG Antikörper wurden in den selben Verdünnungen wie in Beispiel 2.3. angegeben (1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05 und 0.01 mg/ml in PBS/1%BSA) und in gleichen Volumina (50 µl) auf die Platten pipettiert und die Farbreaktion mit ABTS analog gemessen.

Die Subklonierung bzw. Isolierung erfolgte nach COLLER, H. S. & COLLER, B. S., Method in Enzymol. 121:412 - 417, 1983, wonach die Hybridomzellen in Medium derart verdünnt wurden, daß gemäß einer Poisson-Verteilung in jedem Loch einer Kulturplatte statistisch 0,3 Zellen vorlagen. Gemäß der oben beschriebenen Trypanblaufärbung wurde die Zellzahl der jeweiligen Hybridome bestimmt und Verdünnungsreihen (10,3,1 und 0,3 Zellen pro 0,1 ml und pro Loch) in Zellkulturmedium (RPMI 1640 (GIBCO BRL), 5% fötales Käberserum (GIBCO BRL) 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 0,3 mg/ml Glutamin) durchgeführt. Für jede Verdünnung wurden auf die 96 Loch Rundboden-Kulturplatten (Costar, Cambridge, USA) 100µl der Zellsuspensions-verdünnungen ausplattiert und bei 37°C, 7% CO_2, für eine Woche kultiviert.

Für die zweite Selektion wurden 5 x 10^7 Zellen der DIG-Hybridome ohne HGPRT Defekt (nicht HAT-sensitive Zellen) für 15 Minuten bei Raumtemperatur in 5 ml Iodoacetamid, 15 µmol, (Sigma) inkubiert und 3 mal in RPMI 1640 gewaschen.

Anschließend wurden die jeweiligen DNP-und DIG-Hybridomzellen (je 2 x 10^7 Zellen) gemischt, 2 mal in 50 ml RPMI 1640 gewaschen (1400 upm bzw. 300 x g, 5 Minuten, Raumtemperatur), gemäß Beispiel 3.2. fusioniert und analog hierzu weiterbearbeitet.

3.4. Herstellung von Tetradomen über Polyethylenglycol (PEG) Fusion

Für die Fusion der beiden Hybridomzellinien aus Beispiel 3.3. (DNP- und DIG-Hybridome) wurden jeweils 2x10^7 Zellen in 50 ml RPMI 1640 Medium aufgenommen und 3 mal gewaschen (400 x g, 5 Minuten, Raumtemperatur). Die Zellpellets wurden anschließend unter leichtem Schütteln in 37°C warmen PEG 4000 (1 ml) (Boehringer Mannheim, Deutschland) resuspendiert, auf 50 ml mit RPMI 1640 Medium aufgefüllt und bei 200 x g bei Raumtemperatur für 5 Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurde der Fusionsansatz in 8,0 ml Selektionsmedium (RPMI 1640 mit Glutamax I(Gibco BRL), 10% fötales Kälberserum (FCS),

dekomplementiert für 30 Minuten bei 56°C (Gibco BRL), 0,1% Ciprofloxacin (Bayer AG, Deutschland), $5x10^{-3}$ M Hypoxanthin, $2x10^{-5}$ M Aminopterin, $8x10^{-4}$ M Thymidin, 100 IU IL-6/ml (Sigma)) aufgenommen und in 24 Lochplatten (Costar, Cambridge, USA) mit 5 x 10^6 Zellen/ml und 1,0 ml/Loch unter sterilen Bedingungen in einem Brutschrank (Tecnomara, Heraeus, Osterode, Deutschland) in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre mit einem CO_2 Gehalt von 7% und bei konstanter Temperatur von 37°C pipettiert. Das Heranwachsen von Hybrid-Hybridomen (Tetradomen) wurde im Umkehrmikroskop überprüft und im Überstand die bispezifische Immunglobulinproduktion durch ELISA nachgewiesen.

Für diesen ELISA wurde wie folgt vorgegangen: Rinderserum Albumin (BSA) wurde gemäß dem Protokoll von Beispiel 1.1. und 1.2 mit DNP haptenisiert. Die erhaltenen BSA-DNP Konjugate (10 µg/ml) wurden an 96 Lochplatten gebunden (PBS, 4°C, über Nacht). Nach Absättigung der Platten mit 10% fötalem Kälberserum (FCS)/PBS (100 µl pro Loch) für 30 Minuten wurde der Überstand der Tetradomkulturen (50 µl pro Loch) zugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 maligem Waschen mit PBS/10% FCS (200 µ l/Loch wurde DIG-konjugierte Peroxidase, welche analog zu Beispielen 1.1. und 1.2. hergestellt wurden, in einer Verdünnung von 1:2000 aus einer Stammlösung (1 mg/ml) pro Loch zupipettiert (100 µl pro Loch) und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 maligem Waschen (PBS/10% FCS, 200 µl pro Loch) wurde gemäß Beispiel 2.3. ABTS hinzugegeben und anschließend wie in Beispiel 2.3. analysiert.

Tetradomkulturen, in welchem die gewünschten bispezifischen anti-DNP:anti-DIG Antikörper nachgewiesen werden konnten, wurden anschließend bis zu 20 mal subkloniert. Die produzierten Antikörper wurden 3 mal mit Tris-Puffer (20 mM, pH 8.0) verdünnt, steril filtriert (0.2 µm, Millipore) und über eine Q-Sepharose Fast-Flow Säule (Pharmacia) aufgereinigt. Die Elution der Antikörper Fraktion erfolgte durch einen Schrittgradienten gegen NaCl (0.01 - 0,5 M NaCl). Diejenigen Fraktionen, in denen Antikörper nachgewiesen werden konnten, wurden im weiteren mit 2 M $NH_4(SO_4)_2$ zu einer Endkonzentration von 0.85 M ($NH_4(SO_4)_2$ verdünnt. Die bispezifischen Antikörper wurden weiter aufgereinigt auf einer Phenyl-Superose-Säule (Pharmacia) aus der sie durch einen kontinuierlichen Gradienten von 0.85 M $NH_4(SO_4)_2$/0.1 M Na_2HPO_4, pH 7.2, bis 0.001 M $NH_4(SO_4)_2$/0.1 M Na_2HPO_4, pH 7.2, eluiert wurden.